



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας» «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**«Μελέτη του μηχανισμού αποδόμησης του καρβαμιδικού
νηματωδοκτόνου/εντομοκτόνου oxamyl σε διάφορα έδαφη από την
Κρήτη»**

ΚΑΡΑΪΣΚΟΣ ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ

Λάρισα 2012

**«Μελέτη του μηχανισμού αποδόμησης του καρβαμιδικού
νηματωδοκτόνου/εντομοκτόνου oxamyl σε διάφορα έδαφη από την Κρήτη»**

**«Study of the mechanism of degradation of the carbamate nematocide oxamyl in
different soils from the area of Crete»**

Υπεύθυνος Καθηγητής

Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής Επιτροπή:

- Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Τσιρόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής Χημείας, Ανάλυσης και Προσδιορισμού Οργανικών Ουσιών, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την πολύτιμη καθοδήγηση και πολύ σημαντική βοήθεια που μου πρόσφερε στην οργάνωση των πειραμάτων, στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων, στη συγγραφή και στη διόρθωση του κειμένου της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Επίσης, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Καρα για την ανυπολόγιστη βοήθεια και συμβολή του σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας. Ακόμη, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία κατά τη διάρκεια της παραμονής μου σ' αυτό.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την συνεχή υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αποδόμηση του oxamyl σε εδάφη από την Κρήτη με ή χωρίς ιστορικό χρήσης της συγκεκριμένης φυτοπροστατευτικής ουσίας καθώς και ο ακριβής μηχανισμός διάσπασης, βιοτικός ή αβιοτικός, του oxamyl στα συγκεκριμένα εδάφη. Η διάσπαση του oxamyl σε όλα τα εδάφη συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό oxime το οποίο στα περισσότερα εδάφη αποδομήθηκε περαιτέρω.

Λόγω της ευαισθησίας του oxamyl, όπως και των λοιπών καρβαμιδικών εντομοκτόνων εδάφους στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης αξιολογήθηκε το ιστορικό χρήσης oxamyl στα διάφορα εδάφη ως παράγοντας που επιταχύνει την διάσπαση του νηματωδοκτόνου. Στατιστική ανάλυση έδειξε ότι το ιστορικό του εδάφους δεν επηρέασε σημαντικά την υπολειμματικότητα του oxamyl. Το παραπάνω αποτέλεσμα έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει την εξάρτηση του oxamyl από την επιταχυνόμενη μικροβιακή διάσπαση. Θα πρέπει να τονιστεί όμως ότι στην συγκεκριμένη μελέτη η ύπαρξη ή όχι ιστορικού oxamyl αξιολογήθηκε με βάση στοιχεία που δόθηκαν από τους παραγωγούς χωρίς να είμαστε σε θέση να αξιολογήσουμε την εγκυρότητα τους. Επίσης η περιορισμένη εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης για το oxamyl θα μπορούσε να αποδοθεί στα ιδιαίτερα χαμηλά pH των εδαφών. Ο ρόλος των μικροοργανισμών στην αποδόμηση του oxamyl αξιολογήθηκε με την παράλληλη παρακολούθηση της διάσπασης του νηματωδοκτόνου σε εδάφη που αποστειρώθηκαν με μια σχετικά ήπια μέθοδο αποστείρωσης (χλωροφόρμιο). Στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η αποστείρωση δεν οδήγησε σε σημαντική επιβράδυνση της αποδόμησης του oxamyl στα διάφορα εδάφη. Αυτό μπορεί να αποδοθεί είτε στην περιορισμένη συμμετοχή των μικροοργανισμών στην αποδόμηση του oxamyl είτε σε μειωμένη επιτυχία και διάρκεια της αποστείρωσης των εδαφών. Εξαίρεση στα παραπάνω αποτέλεσαν 3 εδάφη όπου η αποστείρωση με χλωροφόρμιο οδήγησε σε σημαντική επιβράδυνση της διάσπασης του oxamyl επιβεβαιώνοντας την συμμετοχή των μικροοργανισμών στην αποδόμηση του oxamyl στα συγκεκριμένα εδάφη. Η διαφοροποίηση των συγκεκριμένων εδαφών είναι

πιθανό να οφείλεται στην ανάπτυξη στα εδάφη αυτά πληθυσμού εξειδικευμένων καταβολικών μικροοργανισμών που είναι προσαρμοσμένοι σε συνθήκες όξινου pH και χρησιμοποιούν το oxamyl ως πηγή ενέργειας για την αύξηση τους.

Σε δύο εδάφη αξιολογήθηκε και η διάσπαση του oxamyl σε δείγματα που αποστειρώθηκαν με αυτόκαυστο (ιδιαίτερα δραστική μέθοδος) σε αντιπαραβολή με εδάφη που αποστειρώθηκαν με αυτόκαυστο τα οποία στην συνέχεια εμβολιάστηκαν με φρέσκο έδαφος και επωάστηκαν για 10 ημέρες ώστε να επανεγκατασταθεί η μικροβιακή κοινότητα στο αποστειρωμένο έδαφος (απόλυτος βιολογικός μάρτυρας). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην υπολειμματικότητα του oxamyl μεταξύ των δειγμάτων που αποστειρώθηκαν ή αποστειρώθηκαν και επανεμβολιάστηκαν με νέο έδαφος. Το παραπάνω αποτελεί περαιτέρω ένδειξη για τον σημαντικό ρόλο αβιοτικών παραγόντων όπως το pH στην διάσπαση του oxamyl.

Τέλος αξιολογήθηκε η επίδραση αβιοτικών παραγόντων όπως το pH στην αποδόμηση του oxamyl. Στατιστική ανάλυση έδειξε ότι υπήρχε σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του DT50 των εδαφών που δεν υπέστησαν αποστείρωση με χλωροφόρμιο και του pH, δηλαδή παρατηρήθηκε αυξημένη υπολειμματικότητα του oxamyl στα εδάφη με όξινο pH. Η συγκεκριμένη αρνητική συσχέτιση κατέστη μη στατιστικά σημαντική όταν στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν και DT50 τιμές από τα δείγματα που είχαν υποστεί αποστείρωση με χλωροφόρμιο καταδεικνύοντας ότι και άλλοι παράγοντες (όπως η μικροβιακή διάσπαση) εκτός του pH, συνεισφέρουν μερικώς στην εξήγηση της τύχης του oxamyl στα συγκεκριμένα εδάφη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο Πρώτο

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Τύχη φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο έδαφος και ρύπανση.....	9
1.2. Μικροβιακή αποδόμηση.....	11
1.3. Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση	13
1.3.1. Εδαφικοί παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης.....	14
1.3.2. Σταθερότητα επιταχυνόμενης αποδόμησης.....	16
1.3.3. Διασταυρωτή επιταχυνόμενη αποδόμηση.....	16
1.4. Καρβαμιδικά φάρμακα.....	17
1. 4.1. Χημική δομή καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων.....	17
1.4.2. Τρόπος δράσης των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων.....	18
1.4.3 Μικροβιακή διάσπαση καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων.....	18
1.5. Oxamyl.....	19
1.5.1. Μεταβολισμός του oxamyl στο έδαφος σε αερόβιες συνθήκες.....	20
1.5.2. Μεταβολισμός του oxamyl στο έδαφος σε αναερόβιες συνθήκες...	21
1.5.3. Χρόνος ημιζωής (Half-life) DT50 του oxamyl στο έδαφος.....	22
1.6. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας.....	24

Κεφάλαιο Δεύτερο

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.1 Δείγματα Εδάφους.....	25
2.2. Μετρήσεις εδαφολογικών χαρακτηριστικών.....	26
2.2.1 Προσδιορισμός της οργανικής ουσίας των εδαφών.....	27
2.2.2 Προσδιορισμός του pH των εδαφών.....	27
2.2.3 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών.....	27
2.2.4 Προσδιορισμός της υγρασίας των εδαφών.....	28
2.3. Μέθοδος ανάλυσης των υπολειμμάτων του oxamyl	28
2.3.1. Υγρή Χρωματογραφία	29
2.3.2. Διαλύτες και γεωργικά φάρμακα	29
2.3.3. Καμπύλες αναφοράς.....	29

2.3.4 Μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων οξαμυλ και οξαμυλ oxime σε δείγματα εδάφους.....	30
2.4. Μελέτη της αποδόμησης του οξαμυλ στα δείγματα εδάφους.....	30
2.5. Στατιστική επεξεργασία.....	31

Κεφάλαιο Τρίτο

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
3.1. Εδαφολογικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν.....	33
3.2. Αποδόμηση οξαμυλ	34
3.2.1. Απόδομηση του οξαμυλ σε εδάφη από πατατοκαλλιέργεια της περιοχής Λασιθίου.....	34
3.2.2. Δείγματα από την περιοχή Μαλίων με καλλιέργειες ελιάς ή μπανάνας.....	45

Κεφάλαιο Τέταρτο

4.1.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
4.2. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Τύχη φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο έδαφος και ρύπανση

Σύμφωνα με την οδηγία 414/91 της Ε.Ε., φυτοπροστατευτικά προϊόντα (plant protection products) είναι οι δραστικές ουσίες και τα σκευάσματα τα οποία περιέχουν μια ή περισσότερες δραστικές ουσίες, προσφέρονται με τη μορφή με την οποία παραδίδονται στον χρήστη και προορίζονται για να:

- ❖ προστατεύουν τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδος επιβλαβείς οργανισμούς ή να παραλαμβάνουν τη δράση τους
- ❖ επηρεάζουν τις βιολογικές διεργασίες των φυτών, (εκτός αν πρόκειται για θρεπτικές ουσίες)
- ❖ διατηρούν τα φυτικά προϊόντα (εκτός και αν πρόκειται για ουσίες που κατατάσσονται στα συντηρητικά)
- ❖ καταστρέφουν τα ανεπιθύμητα φυτά
- ❖ καταστρέφουν μέρη των φυτών, να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίζουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξή τους

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η χρήση των φυτοπροστατευτικών ουσιών στις καλλιέργειες επιφέρει σημαντικά οφέλη στη γεωργία και την οικονομία. Οι φυτοπροστατευτικές ουσίες επιτρέπουν στους αγρότες να παράγουν πιο ανθεκτικά και πιο άφθονα γεωργικά προϊόντα σε μικρότερες καλλιεργήσιμες εκτάσεις και έτσι να έχουν την δυνατότητα να τα προσφέρουν σε πιο προσιτές τιμές. Όμως τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν σημαντική ομάδα οργανικών ρύπων. Με βάση μελέτη του Ο.Η.Ε., εκτιμάται ότι από τη συνολική ποσότητα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται για αγροτικούς

σκοπούς μόνο το 1% φτάνει τελικά, στο καλλιεργούμενο φυτό, ενώ το υπόλοιπο καταλήγει και ρυπαίνει το περιβάλλον, δηλαδή το έδαφος, τον αέρα και κυρίως το νερό (Malato et al., 2001). Μέχρι τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο, τα πρώτα χημικά εντομοκτόνα περιελάμβαναν ανόργανα στοιχεία, όπως το θείο, το αρσενικό και τον υδράργυρο. Ακολούθησαν αρκετά, φυτικής προέλευσης υλικά, όπως τα πυρεθρινοειδή (χρυσάνθεμα), η νικοτίνη και η ροτενόνη. Τα καρβαμιδικά όπως και τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα αποτελούν σημαντικές και παραδοσιακές ομάδες εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται εδώ και 50 περίπου χρόνια. Πρωτοχρησιμοποιήθηκαν ως αντικαταστάτες των λιπόφιλων και ιδιαίτερα υπολειμματικών οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων όπως το DDT (Tagusawana & Jacobson 1977). Το DDT παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1874 και μέχρι το 1939 δεν είχαν ανακαλυφθεί οι εντομοκτόνες ιδιότητές του. Στην συνέχεια αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι χαμηλού κόστους παραγωγής του και χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην πρόληψη της ελονοσίας και του κίτρινου πυρετού. Κατά τη διάρκεια των δεκαετιών 1940 και 1950 η παγκόσμια χρήση του DDT στον έλεγχο των εντόμων επέφερε σημαντικά οφέλη στην γεωργία. Όμως η εκτεταμένη χρήση του DDT είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα παράσιτα, αλλά και περιβαλλοντικές συνέπειες (WHO, 1979). Σήμερα η αυξανόμενη ανάγκη για καλύτερη προστασία των καλλιεργειών έχει πολλαπλασιάσει τις επεμβάσεις με γεωργικά φάρμακα. Έτσι ολοένα και περισσότερο κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη μεθόδων τόσο για την προστασία της υγείας των ανθρώπων αλλά και για την προστασία και αποκατάσταση του περιβάλλοντος από τη ρύπανση με γεωργικά φάρμακα. Η χρήση βιολογικών μεθόδων για περιβαλλοντική εξυγίανση αποτελεί ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο. Έτσι η χρήση μικροοργανισμών ή των ενζύμων που παράγουν, στην αποτοξικοποίηση γεωργικών φαρμάκων θεωρείται μία θεμιτή και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο απορρύπανσης τους (Singh & Walker 2006).

Οι διεργασίες που επηρεάζουν την τύχη των φυτοπραστατευτικών ουσιών ύστερα από την εφαρμογή τους στο έδαφος εξαρτώνται τόσο από τα χαρακτηριστικά και τη σύσταση του εδάφους όσο και από τις ιδιότητες της ίδιας της ένωσης. Οι διεργασίες αυτές είναι η διάσπαση με την βοήθεια

αβιοτικών παραγόντων, η προσρόφηση, η εξάτμιση, η φωτόλυση, η έκπλυση, η επιφανειακή απορροή και η πρόσληψη από τα φυτά. Η μικροβιακή αποδόμηση αποτελεί επίσης μια από τις σημαντικότερες διεργασίες, με την οποία απομακρύνονται οι περισσότερες φυτοπροστατευτικές ουσίες στο έδαφος.

1.2. Μικροβιακή αποδόμηση

Μικροβιακή αποδόμηση ή βιοαποδόμηση (biodegradation ή biotransformation) ονομάζεται η διάσπαση οργανικών ουσιών σε μικρότερα μόρια μέσω της δράσης ενζύμων που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς. Στην διάρκεια της μικροβιακής αποδόμησης σύνθετα οργανικά μόρια μετατρέπονται σε πιο απλά ή τοξικές ουσίες σε λιγότερο ή μη-τοξικές, είτε υπό αερόβιες συνθήκες (παρουσίας οξυγόνου) είτε υπό αναερόβιες συνθήκες (απουσίας οξυγόνου). Οι πιο πολλοί μικροοργανισμοί, που κατοικούν στο έδαφος, όπου το οξυγόνο είναι άφθονο αποδομούν τις φυτοπροστατευτικές ουσίες μέσω του αερόβιου μεταβολισμού. Όταν μία φυτοπροστατευτική ουσία υφίσταται πλήρη αερόβιο μεταβολισμό, ανοργανοποιείται και μετατρέπεται πλήρως σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Υπό συνθήκες αναερόβιου μεταβολισμού, η αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς μπορεί να παράγει πρόσθετα προϊόντα όπως μεθάνιο.

Η μικροβιακή αποδόμηση χαρακτηρίζεται ως μια πολύπλοκη αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων, η οποία συχνά διαφοροποιείται ανάλογα με το μικροοργανισμό-αποδομητή. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τις οργανικές ενώσεις ως υποστρώματα ανάπτυξής τους, ενώ υπάρχουν και μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αποδομούν ενώσεις διαφορετικών κατηγοριών.

Η αποδόμηση των περισσότερων σύγχρονων φυτοπροστατευτικών ουσιών στο έδαφος οφείλεται στη μικροβιακή διάσπαση (Alexander, 1985). Η ύπαρξη και η ένταση του φαινομένου της μικροβιακής αποδόμησης επηρεάζονται τόσο από το μέσο στο οποίο γίνεται η αποδόμηση (έδαφος) όσο και από τους μικροοργανισμούς-αποδομητές και σε πολλές περιπτώσεις οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν (Simon et al., 1992). Στο έδαφος η

μικροβιακή διάσπαση των φυτοπροστατευτικών ουσιών γίνεται από διάφορες ομάδες μικροοργανισμών όπως μύκητες, βακτήρια, ακτινοβακτήρια και άλγη (Levanon, 1993). Η αποδόμηση μιας φυτοπροστατευτικής ουσίας μπορεί να πραγματοποιηθεί με την δράση ενός μικροοργανισμού ή συχνότερα ομάδας μικροοργανισμών (consortiums) (Aislabie and Lloyd-Jones, 1995).

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί του εδάφους αναπτύσσονται σε λεπτά στρώματα που περιβάλλουν τα κολλοειδή του εδάφους. Ταχύτερη μικροβιακή αποδόμηση παρατηρείται σε περιοχές στις οποίες επικρατούν θερμά και υγρά κλίματα (Torr et al., 1995). Υψηλότεροι μικροβιακοί πληθυσμοί και επομένως υψηλότερη μικροβιακή δραστηριότητα παρατηρείται στα επιφανειακά εδαφικά στρώματα με αποτέλεσμα ταχύτερη αποδόμηση φυτοπροστατευτικών ουσιών να πραγματοποιείται στο επιφανειακό έδαφος (Accineli et al., 2001). Αντίθετα οι ολιγοτροφικές συνθήκες που επικρατούν στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα έχουν ως αποτέλεσμα να υπάρχουν μικρότεροι μικροβιακοί πληθυσμοί με χαμηλότερη δραστηριότητα και επομένως να παρατηρούνται βραδύτεροι ρυθμοί αποδόμησης των φυτοπροστατευτικών ουσιών. Όπως όλοι οι κανόνες έχουν τις εξαιρέσεις τους, έτσι και σε αυτήν την περίπτωση έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία περιπτώσεις όπου ο ρυθμός αποδόμησης συγκεκριμένων φυτοπροστατευτικών ουσιών στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα είναι ο ίδιος ή και υψηλότερος σε σύγκριση με το αντίστοιχο επιφανειακό έδαφος (Di et al., 1998).

Για να πραγματοποιηθεί η αποδόμηση μιας φυτοπροστατευτικής ουσίας, οι μικροοργανισμοί του εδάφους ή τα καταβολικά ένζυμα που παράγουν πρέπει να έρθουν σε επαφή με την ουσία και στη συνέχεια αυτή ή τα προϊόντα του μεταβολισμού της να εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου (Aislabie and Lloyd-Jones, 1995). Η πλήρης αποδόμηση ενός οργανικού μορίου σε ανόργανα (mineralization) είναι συνήθως προϊόν μικροβιακής αποδόμησης. Μέσω της διαδικασίας αυτής οι μικροοργανισμοί αυξάνουν τη βιομάζα τους χρησιμοποιώντας τον άνθρακα των οργανικών ενώσεων ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Με τον τρόπο αυτό αυξάνουν τους πληθυσμούς τους σε αριθμό και μέγεθος. Η μελέτη και απομόνωση μικροοργανισμών υπεύθυνων για την αποδόμηση φυτοπροστατευτικών ουσιών που χρησιμοποιούν τη φυτοπροστατευτική ουσία ως πηγή ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους έδειξε ότι αυτά συνήθως είναι βακτήρια, μύκητες

και ακτινοβακτήρια (Suett et al., 1996). Η μικροβιακή διάσπαση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε άμεσα διαμέσου μεταβολικών διεργασιών, όπως ανοργανοποίηση, συμμεταβολισμός, πολυμερισμός, συμπλοκοποίηση και συσσώρευση, είτε έμμεσα μέσα από επιδράσεις της μικροβιακής δραστηριότητας που μεταβάλλουν το pH και ενεργοποιούν νέες οξειδοαναγωγικές διεργασίες (Bollag & Liu 1990, Kookana et al., 1998).

1.3. Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση

Η ικανότητα των μικροοργανισμών να προκαλούν αυξημένο καταβολισμό των φυτοπροστατευτικών ουσιών μετά από επανειλημμένη εφαρμογή τους στο ίδιο έδαφος, μειώνοντας έτσι την υπολειμματικότητα των φυτοπροστατευτικών ουσιών, αποδίδεται με τον όρο επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση (Chapman και Harris, 1990). Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση έχει αναφερθεί σε περιπτώσεις επανειλημμένης χρήσης μυκητοκτόνων (Walker et al., 1986), εντομοκτόνων/νηματοδοκτόνων (Karpouzas et al, 2004a,b) και ζιζανιοκτόνων (Coy et al., 1996). Έχει παρατηρηθεί ότι τα βακτήρια αποτελούν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης σε αντίθεση με τους μύκητες που έχουν περιορισμένο ρόλο (Arbeli et al, 2007). Το φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης αποτελεί αποτέλεσμα της σταδιακής μικροβιακής προσαρμογής στο εφαρμοζόμενο γεωργικό φάρμακο και στην ακραία του μορφή οδηγεί συνήθως σε σημαντική μείωση στην αποτελεσματικότητα του γεωργικού φαρμάκου (Karpouzas & Walker, 2000b). Αποτέλεσμα της επιταχυνόμενης αποδόμησης είναι η αποτυχία της φυτοπροστατευτικής ουσίας να περιορίσει αποτελεσματικά τους εχθρούς-στόχους λόγω της μεγάλης μείωσης της παραμονής της στο έδαφος. Η επιταχυνόμενη αποδόμηση είχε αρχικά θεωρηθεί ως ευεργετική διεργασία που οδηγεί στην ταχύτατη μείωση των ανεπιθύμητων υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων που εφαρμόζεται στο έδαφος και συνεπώς μείωνε την πιθανότητα μετακίνησής τους στα υπόγεια και επιφανειακά νερά (Felsot, 1989). Παρόλα αυτά το φαινόμενο αυτό μπορεί να επιφέρει οικονομικές απώλειες στους καλλιεργητές, αφού μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της

αποτελεσματικότητας ορισμένων φυτοπροστατευτικών ουσιών λόγω της ταχύτατης μείωσης της συγκέντρωσής τους σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που απαιτούνται για τον έλεγχο των οργανισμών- στόχων (Torr et al., 1995).

Ενδείξεις ύπαρξης επιταχυνόμενης αποδόμησης αναφέρθηκαν από τους (Suett et al., 1996) για το νηματωδοκτόνο carbofuran και αφορούσαν την αποτυχία του ελέγχου κυστωδών νηματωδών (*Globodera rostochiensis* και *Globodera pallida*) σε καλλιέργεια πατάτας στη Μακεδονία. Επαναλαμβανόμενη εφαρμογή των νηματωδοκτόνων aldicarb, oxamyl και ethoprophos οδήγησε σε σημαντική μείωση της αποτελεσματικότητάς τους στην Ολλανδία (Smelt et al., 1987). Το ίδιο συμπέρασμα για την αποτελεσματικότητα των νηματωδοκτόνων aldicarb και oxamyl αποδείχτηκε σε ανθοκομικές καλλιέργειες στην Ολλανδία (Suett et al., 1996). Παραδείγματα μείωσης της αποτελεσματικότητας των νηματωδοκτόνων carbofuran και ethoprophos παρουσιάστηκαν από τους Karpouza et al. (1999a και 1999b).

Η επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση προκύπτει από την αλληλεπίδραση φυτοπροστατευτικών ουσιών και μικροοργανισμών (Racke and Coats, 1988). Επίσης μπορεί να συμβεί από την συνεργιστική δράση δύο ή περισσότερων μικροοργανισμών (Read, 1986a). Η εμφάνιση της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών ουσιών προϋποθέτει την ύπαρξη ενός μικροβιακού πληθυσμού ικανού να χρησιμοποιήσει τη φυτοπροστατευτική ουσία σαν πηγή θρεπτικών συστατικών με σκοπό την αύξηση και ανάπτυξή του (Felsot and Shelton, 1993).

1.3.1. Εδαφικοί παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης.

Πολλές διεργασίες εμπλέκονται στην αποδόμηση των φυτοπροστατευτικών ουσιών. Τα χαρακτηριστικά του εδάφους όπως δομή, θρεπτική κατάσταση, οργανική ουσία και pH αποτελούν παραμέτρους, με σημαντικές επιδράσεις στον ρυθμό αποδόμησης των φυτοπροστατευτικών ουσιών. Μεταβολή σε ένα από τα χαρακτηριστικά του εδάφους μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη διαθεσιμότητα ή την αποδόμηση των

φυτοπροστατευτικών ουσιών συχνά με εντελώς διαφορετικό τρόπο (Walker and Roberts, 1993). Από τους εδαφικούς παράγοντες το pH και η περιεκτικότητα σε οργανική ουσία επηρεάζουν κυρίως την εμφάνιση και ανάπτυξη της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης.

Ακόμη και μικρές αλλαγές στο pH επιφέρουν σημαντικές μεταβολές στη σύνθεση και δραστηριότητα της μικροβιακής κοινότητας. Στα αλκαλικά εδάφη ευνοείται η εμφάνιση του φαινομένου, είτε άμεσα με επίδραση στη χημική σταθερότητα της φυτοπροστατευτικής ουσίας είτε έμμεσα με επίδραση στη σύνθεση και δραστηριότητα της μικροβιακής κοινότητας (Suett et al., 1996). Επιταχυνόμενη αποδόμηση δεν παρατηρήθηκε για τα νηματωδοκτόνα ethoprophos, aldicarb και oxamyl σε έδαφος με pH 5.6 που είχαν μεταχειριστεί με τα συγκεκριμένα νηματωδοκτόνα επί 10 συνεχή έτη (Smelt et al., 1996, Karpouzas et al., 1999b). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και για το καπνιστικό νηματωδοκτόνο metham sodium όπου 24 ώρες μετά την εφαρμογή του παρατηρήθηκε μηδενική αποδόμηση του σε έδαφος με pH 4.8 ενώ αντίθετα η αποδόμηση της ίδιας δόσης είχε ολοκληρωθεί στο ίδιο χρονικό διάστημα σε εδάφη με pH 7.8 (Suett et al., 1996). Το εδαφικό pH αποτέλεσε πιο σημαντικό παράγοντα στην αποδόμηση του isazofos από ότι ο αριθμός των προηγούμενων μεταχειρίσεων του εδάφους με το συγκεκριμένο νηματωδοκτόνο. Η αποδόμηση του isazofos ήταν πιο έντονη σε εδάφη με σχετικά υψηλό pH (>6.9) ανεξαρτήτως προηγούμενου ιστορικού εφαρμογής του φυτοπροστατευτικού προϊόντος (Somasundaram et al., 1993).

Αύξηση της περιεκτικότητας του εδάφους σε οργανική ουσία συνεπάγεται αύξηση της προσρόφησης των φυτοπροστατευτικών ουσιών από το έδαφος με αποτέλεσμα τη μείωση της διαθεσιμότητάς τους για αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Μικροοργανισμοί υπεύθυνοι για την αποδόμηση του ethoprophos αποδομούσαν το συγκεκριμένο νηματωδοκτόνο πιο αργά σε έδαφος με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία (8.5%) παρά σε αμμώδη εδάφη με περιεκτικότητα σε οργανική ουσία 0.3-2.3% (Karpouzas and Walker 2000c).

1.3.2. Σταθερότητα επιταχυνόμενης αποδόμησης

Η σταθερότητα της επιταχυνόμενης αποδόμησης των εδαφών μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών εδαφών και μεταξύ διαφορετικών φυτοπροστατευτικών ουσιών. Η χρονική στιγμή, στην οποία ένα έδαφος μπορεί ξανά να μεταχειρισθεί με ασφάλεια με την ίδια φυτοπροστατευτική ουσία εξαρτάται από τη δόση εφαρμογής, τη συχνότητα εφαρμογής, τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας και την ικανότητα των μικροοργανισμών να χρησιμοποιούν την ουσία σαν πηγή ενέργειας ή θρεπτικών συστατικών (Anderson et al., 1998). Σημαντικές διαφορές στην διάρκεια του φαινομένου έχουν καταγραφεί μεταξύ οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών νηματωδοκτόνων (Chapman and Harris, 1990). Η επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση των μέθυλο-καρβαμιδικών διαρκεί συνήθως περισσότερο σε συνθήκες αγρού και απουσίας ενδιάμεσων εφαρμογών των συγκεκριμένων φυτοπροστατευτικών ουσιών (Felsot and Shelton, 1993).

1.3.3. Διασταυρωτή επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση

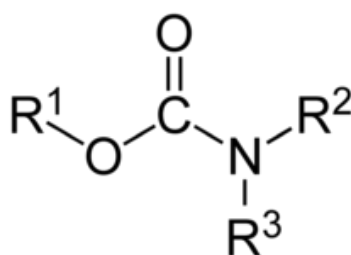
Διασταυρωτή επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο μια φυτοπροστατευτική ουσία αποδομείται ταχύτατα σε έδαφος στο οποίο δεν έχει καταγραφεί προηγούμενη χρήση της, αλλά το έδαφος έχει εκτεθεί σε κάποια άλλη φυτοπροστατευτική ουσία με παρόμοια χημική δομή. Ανάπτυξη διασταυρωτής επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης για το νηματωδοκτόνο carbofuran παρατηρήθηκε μετά από χρήση καρβαμιδικών νηματωδοκτόνων (Morel-Chevillet, κ.α., 1996). Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει καταγραφεί ότι η αποδόμηση μιας φυτοπροστατευτικής ουσίας μπορεί να γίνεται ευκολότερα μετά από εφαρμογή στο έδαφος διαφορετικής, αλλά της ίδιας χημικής ομάδας, φυτοπροστατευτικής ουσίας, παρά ύστερα από εφαρμογή με την ίδια ουσία. Έχει παρατηρηθεί ταχύτερη αποδόμηση του aldicarb ύστερα από προηγούμενη εφαρμογή carbofuran παρά ύστερα από εφαρμογή aldicarb (Suett and Jukes, 1988).

1.4. Καρβαμιδικά φάρμακα

Τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα παράγονται και χρησιμοποιούνται εμπορικά από τη δεκαετία του 1950. Ο κύριος λόγος ανακάλυψης τους ήταν η προσπάθεια για ανακάλυψη ουσιών για την καταπολέμηση εχθρών που ήδη είχαν αρχίσει να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά.. Πέρα από τη χρήση των ενώσεων αυτών στη γεωργία, η οποία αποτελεί και τον κύριο τομέα εφαρμογής τους, κάποια από αυτά χρησιμοποιούνται και για άλλες χρήσεις όπως ως βιοκτόνα στη βιομηχανία αλλά και ως προϊόντα οικιακής χρήσης.

1.4.1. Χημική δομή καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων

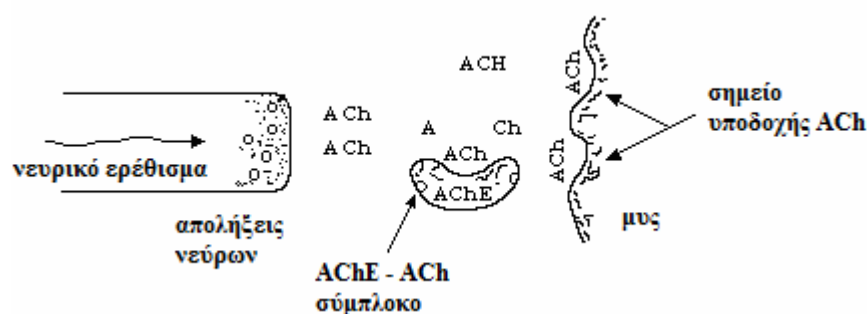
Τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα είναι παράγωγα του καρβαμιδικού οξέος HOC(O)NH_2 . Η γενική δομή των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων φαίνεται στο Σχήμα 1. Η ομάδα R^1 είναι συνήθως αλκοόλη, οξύμη, ή φαινόλη και οι ομάδες R^2 και R^3 είναι υδρογόνο ή αλκυλομάδες (Fact Sheet Population Health Branch. (2002).



Σχήμα 1. Χημική δομή των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων.

1.4.2. Τρόπος δράσης των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων

Τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα, όπως και τα οργανοφωσφορικά, αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση AChE στο νευρικό σύστημα, η οποία καταλύει την υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη σε χολίνη και οξικό οξύ, μειώνοντας έτσι τη συγκέντρωσή του και προκαλούν χολινεργική υπερδιέγερση. Παρόλα αυτά, τα καρβαμιδικά προκαλούν μερικώς αντιστρεπτή αναστολή του ενζύμου. Έτσι, η αναστολή της AChE από τα καρβαμιδικά διαρκεί μόνο λίγα λεπτά ή ώρες σε αντίθεση με αυτή των οργανοφωσφορικών που μπορεί να διαρκέσει 3-4 μήνες (Bjørting-Poulsen et al., 2008). Μια αναπαράσταση της δράσης της ακετυλοχολίνης (ACh) και της (AChE) δίνεται στο σχήμα 2 (Kuhr & Dorough, 1976).



Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης των καρβαμιδικών εντομοκτόνων.

1.4.3. Μικροβιακή διάσπαση καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων

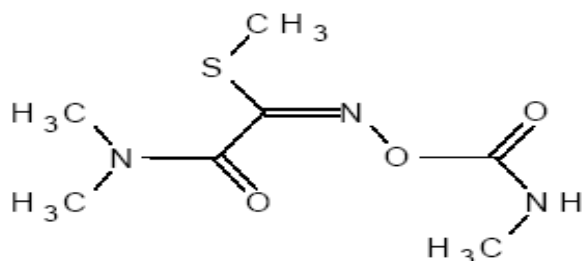
Οι μικροοργανισμοί του εδάφους έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται εύκολα και να υδρολύουν διάφορους τύπους καρβαμιδικών ενώσεων. Το πρώτο βήμα στο μεταβολισμό των καρβαμιδικών περιλαμβάνει την υδρόλυσή τους προς παραγωγή καρβαμικού οξέος, το οποίο διασπάται περαιτέρω σε CO₂ και στην αντίστοιχη αμίνη.

1.5. Oxamyl

Το oxamyl (*N,N*-dimethyl-2-methylcarbamoyloxyimino-2-(methylthio)-acetamide) είναι ένα εύρεος φάσματος καρβαμιδικό εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο και νηματωδοκτόνο που κυκλοφορεί με διάφορα εμπορικά ονόματα.

Η έκθεση στο oxamyl προκαλεί παρόμοιες επιδράσεις με τα άλλα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα αναστέλλοντας το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση αλλά με αντιστρεπτά αποτελέσματα μικρής διάρκειας. Εφαρμόζεται σε διάφορες καλλιέργειες όπως πατάτας και λαχανοκομικών ειδών στο θερμοκήπιο. Μετά τη σχετικά πρόσφατη απόσυρση των εναλλακτικών νηματωδοκτόνων aldicarb και cadusafos, καθώς και την περιορισμένη χρήση του fenamiphos, το oxamyl αποτελεί πλέον ένα από τα πιο δημοφιλή νηματωδοκτόνα μεταξύ των συνθετικών μη καπνιστικών νηματωδοκτόνων στην Ευρώπη.

Το oxamyl παρουσιάζει μέτρια πτητικότητα (31 mPa). Η διαλυτότητά του στο νερό είναι ιδιαίτερα υψηλή (280 g/L) και η οξεία τοξικότητα LD₅₀ διαμέσου της στοματικής οδού σε αρουραίους είναι υψηλή (5,4 mg/kg). Το μοριακό του βάρος είναι 219,4 και η ADI (Acceptable Daily Intake) είναι 0,03 mg/kg, τιμή που το κατατάσσει στην κατηγορία Ι τοξικότητας κατά EPA (Gerstl 1984). Το oxamyl έχει σχετικά μικρή υπολειμματικότητα στο έδαφος και ο χρόνος ημιζωής του κυμαίνεται από 4-20 ημέρες. Υδρολύεται ταχύτατα σε ουδέτερα και αλκαλικά εδάφη και με πιο αργό ρυθμό σε όξινα (Bromilow et al., 1980, Smelt et al., 1983). Δεν προσροφάται ιδιαίτερα στο έδαφος και είναι πιθανή η έκπλυσή του στα υπόγεια ύδατα. Το oxamyl στο έδαφος αποδομείται μέσω υδρόλυσης σε μη τοξικούς μεταβολίτες, όπως oxamyl oxime και oxamic acid. Ο χημικός του τύπος δίνεται στο Σχήμα 3.

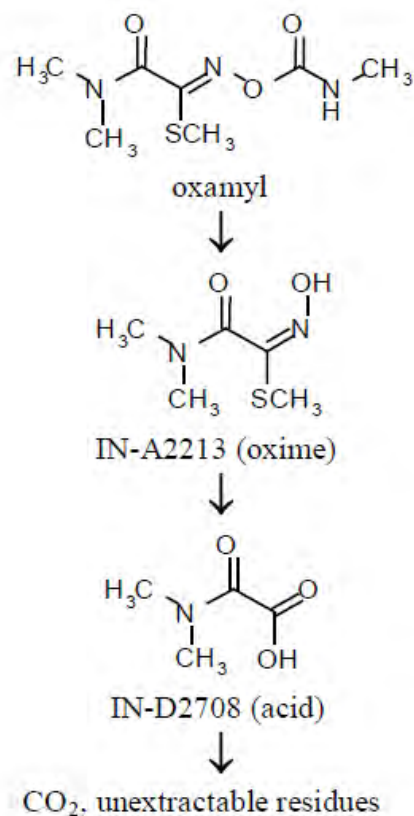


Σχήμα 3: Χημικός τύπος του oxamyl

1.5.1. Μεταβολισμός του oxamyl στο έδαφος σε αερόβιες συνθήκες

Η πορεία της αποδόμησης του oxamyl σε αερόβιες συνθήκες είναι ίδια για όλους τους τύπους εδαφών και όλα τα μέσα εκχύλισης (νερό, μεθανόλη / νερό, ακετονιτρίλιο / νερό). Σε αμμοαργιλοπηλώδες έδαφος (pH 7,7 , οργανική ουσία 1,5%) το oxamyl oxime ήταν το αρχικό προϊόν της αποδόμησης φτάνοντας στην μέγιστη τιμή του 24,3% της εφαρμοσθείσας ποσότητας oxamyl στην 10η ημέρα. Στη συνέχεια σχηματίστηκε το oxamic acid που έφτασε την μέγιστη τιμή του 20,3% την 21η ημέρα. Το τελικό προϊόν της αποδόμησης ήταν το CO₂ και έφτασε στο 45,3% την 51η ημέρα (Spare, 1991). Σε όξινο πηλώδες έδαφος (pH 4,6 , οργανική ουσία 3,7%) τα κύρια προϊόντα μεταβολισμού το oxamyl ήταν CO₂ και oxamic acid (Hawkins et al., 1989). Παρόμοια αποτελέσματα για την πορεία αποδόμησης του oxamyl καταγράφηκαν και σε άλλες μελέτες με διαφορετικούς τύπους εδαφών. Οι Mattson and Smyser (2000) μελέτησαν το μεταβολισμό του oxamyl σε τρία διαφορετικής σύστασης εδάφη: ένα αργιλωπηλώδες έδαφος με ουδέτερο pH (pH 7, οργανική ουσία 0,4%), ένα ελαφρώς αλκαλικό αργιλωπηλώδες έδαφος (pH 7,8 , οργανική ουσία 2,1%) και ένα όξινο αργιλωπηλώδες έδαφος (pH 4,8 , οργανική ουσία 4,4%). Το αρχικό προϊόν της αποδόμησης για όλα τα εδάφη ήταν το oxamyl oxime ενώ με την ολοκλήρωση του πειράματος καταγράφηκε σημαντική ανοργανοποίηση με παραγωγή CO₂ και στα τρία εδάφη.

Γενικά το πρώτο βήμα της πορείας της αποδόμησης του oxamyl είναι η υδρόλυση για τον σχηματισμό oxamyl oxime, που ακολουθείται από το σχηματισμό oxamic acid. Η υδρόλυση μπορεί να οφείλεται και σε αβιοτικές διεργασίες ιδιαίτερα σε αλκαλικές συνθήκες (Harvey and Han, 1978, McNally and Wheeler, 1988b). Στη συνέχεια το oxamyl oxime ανοργανοποιείται σε διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο είναι το κύριο προϊόν της αποδόμησης. Σε αερόβιες συνθήκες η πορεία της αποδόμησης είναι ίδια και στο υπέδαφος και στο επιφανειακό έδαφος με το σχηματισμό του oxamyl oxime, να εξαρτάται από το pH. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ο μεταβολισμός του oxamyl σε αερόβιες συνθήκες

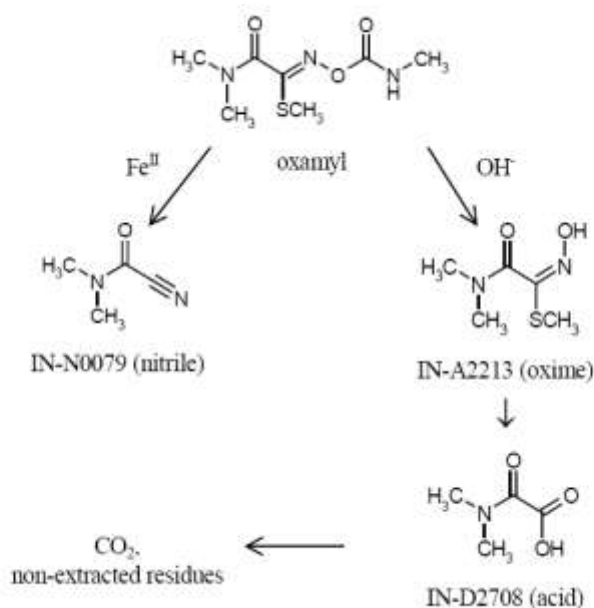


Σχήμα 4: Μεταβολισμός του oxamyl στο έδαφος σε αερόβιες συνθήκες

1.5.2. Μεταβολισμός του oxamyl στο έδαφος σε αναερόβιες συνθήκες

Σε αναερόβιες συνθήκες η αποδόμηση του oxamyl στα επιφανειακά εδάφη ακολουθεί την ίδια πορεία με αυτή σε αερόβιες συνθήκες. Αρχικά με υδρόλυση σχηματίζεται το oxamyl oxime που ακολουθείται από το σχηματισμό του oxamic acid, που με ανοργανοποίηση οδηγεί στο σχηματισμό του CO₂. Η αποδόμηση δεν επηρεάζεται από τις αναερόβιες συνθήκες, αλλά η ανοργανοποίηση γίνεται με πιο αργή ταχύτητα. Σε αναερόβιες συνθήκες στο υπέδαφος, όπου υπήρχαν ιόντα σιδήρου σε επαρκή επίπεδα, το oxamyl εύκολα μετατρέπεται στο νιτρίλιο DMCF (N,N-dimethyl-2-nitriloacetamide), με αναγωγή του σιδήρου. Ανάλογα με το pH και τα επίπεδα σιδήρου η αποδόμηση του oxamyl μπορεί να προχωρήσει παράλληλα με αναγωγή για την παραγωγή του νιτρίλιου και με υδρόλυση για την παραγωγή oxamyl

oxime. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ο μεταβολισμός του oxamyl σε αναερόβιες συνθήκες



Σχήμα 5: Μεταβολισμός του oxamyl στο έδαφος σε αναερόβιες συνθήκες

1.5.3. Χρόνος ημιζωής (Half-life) DT₅₀ του oxamyl στο έδαφος

Χρόνος ημιζωής είναι ο χρόνος (σε ημέρες, εβδομάδες ή έτη) που απαιτείται για να διασπασθεί το 50% της αρχικής συγκέντρωσης ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος. Με βάση αυτόν το συντελεστή τα φυτοφάρμακα ταξινομούνται όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Ταξινόμηση της υπολειμματικότητας των φυτοπροστατευτικών ουσιών στο έδαφος

DT ₅₀ (ημέρες)	Ταξινόμηση
<20	Μη υπολειμματικά
20-60	Αρκετά υπολειμματικά
60-180	Υπολειμματικά

>180	Ιδιαίτερα Υπολειμματικά
------	-------------------------

Η υπολειμματικότητα και ο χρόνος ημιζωής μια φυτοπροστατευτικής ουσίας στο έδαφος εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία, τη μηχανική σύσταση του εδάφους και το είδος των μικροοργανισμών που υπάρχουν και που μπορούν να διασπάσουν την συγκεκριμένη ουσία. Επειδή οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών μειώνονται σε μεγάλο βαθμό κάτω από τη περιοχή της ριζόσφαιρας των φυτών, οι φυτοπροστατευτικές ουσίες που διηθούνται πέρα από αυτό το βάθος είναι λιγότερο πιθανό να αποδομηθούν ή αποδομούνται με βραδείς ρυθμούς (Rao & Hornsby, 2001).

Ο χρόνος ημιζωής του oxamyl ποικίλλει από μερικές μέρες έως αρκετές εβδομάδες και εξαρτάται από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Στην μελέτη των Harvey και Han (1978) σε εργαστηριακές συνθήκες μελετήθηκε η αποδόμηση του oxamyl σε ένα αμμοπηλώδες έδαφος (pH 6,8) και σε ένα αμμώδες έδαφος (pH 6,4). Ο χρόνος ημιζωής του oxamyl ήταν 11 μέρες στο αμμοπηλώδες έδαφος και 15 μέρες στο αμμώδες. Σε ένα άλλο πείραμα σε εργαστηριακές συνθήκες οι Smelt et al. (1979) μελέτησαν την επίδραση της εδαφικής υγρασίας στην αποδόμηση του oxamyl σε ένα αμμοπηλώδες έδαφος (pH 5.4, οργανική ουσία 4.5%), σε ένα αργιλοπηλώδες (pH 7.1, οργανική ουσία 4.5%), σε ένα αμμοπηλώδες (pH 7.4, οργανική ουσία 1.1%) και σε ένα αμμώδες με υψηλό ποσοστό οργανικής ουσίας (pH 5.2, οργανική ουσία 9.0%). Στα εδάφη στα οποία η υγρασία ήταν πάνω από το σημείο μάρανσης η περίοδος ημιζωής του oxamyl συσχετιζόταν με το pH, με μεγαλύτερη τιμή να έχουμε στα δύο όξινα εδάφη (34 έως 68 ημέρες), παρά στα δύο αλκαλικά (12 έως 20 ημέρες). Σε συνθήκες καλλιέργειας η περίοδος ημιζωής του oxamyl κυμάνθηκε από 7 έως 28 μέρες μετά την ενσωμάτωση κοκκώδους σκευάσματος oxamyl στο έδαφος σε εδάφη αμμώδη και αμμοπηλώδη, με εύρος pH από 5,9 έως 7 και οργανική ουσία από 2,3% έως 5,4% (Ambrose et al., 2000).

1.6. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Τα γεωργικά φάρμακα, τα οποία έχουν το μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, όσον αφορά τη συμπεριφορά και τύχη τους στο έδαφος που οδηγεί τελικά στη ρύπανση, είναι εκείνα που εφαρμόζονται άμεσα στο έδαφος ή κατά την εφαρμογή τους σημαντικό ποσοστό της αρχικής δόσης καταλήγει στο έδαφος. Μεταξύ των γεωργικών φαρμάκων που ικανοποιούν τις παραπάνω προϋποθέσεις είναι και το νηματωδοκτόνο oxamyl, το οποίο είναι το αντικείμενο έρευνας της παρούσας διατριβής. Ο βασικός στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η αξιολόγηση της υπολειμματικότητας και ιδιαίτερα της μικροβιακής διάσπασης του καρβαμιδικού νηματωδοκτόνου oxamyl σε εδάφη από καλλιέργειες κυρίως πατάτας αλλά και μπανάνας στην Κρήτη με ή χωρίς ιστορικό χρήσης του συγκεκριμένου γεωργικού φαρμάκου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Δείγματα Εδάφους

Συνολικά για το πειραματικό μέρος της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν δώδεκα δείγματα εδάφους, τα οποία στάλθηκαν από την Κρήτη. Πιο συγκεκριμένα υπάρχουν δέκα δείγματα εδάφους από αγρούς από την περιοχή του Λασιθίου. Από τα δείγματα αυτά επτά είχαν ιστορικό χρήσης oxamyl και τρία δεν είχαν ιστορικό χρήσης oxamyl. Εκτός των δειγμάτων από το Λασιθί μελετήθηκαν και ένα δείγμα από την περιοχή των Μαλίων από αγρό με καλλιέργεια ελιάς χωρίς ιστορικό χρήσης oxamyl και ένα δείγμα επίσης από την περιοχή των Μαλίων από αγρό με καλλιέργεια μπανάνας με ιστορικό χρήσης oxamyl .

Δείγματα και προέλευση	Ιστορικό Χρήσης oxamyl
Λασιθί 2	OXI
Λασιθί 4	OXI
Λασιθί 5	NAI
Λασιθί 6	NAI
Λασιθί 7	NAI
Λασιθί 8	OXI
Λασιθί 9	NAI
Λασιθί 10	NAI
Λασιθί 11	NAI
Λασιθί 12	NAI
Μάλια Ελιά	OXI
Μάλια Μπανάνα	NAI

Τα 10 δείγματα από την περιοχή του Λασιθίου διαχωρίστηκαν σε 2 ίσα υπο-δείγματα ενώ τα δύο δείγματα από την περιοχή των Μαλίων (για τα οποία υπήρχε διαθέσιμη μεγαλύτερη ποσότητα εδάφους) διαχωρίστηκαν σε 4

υποδείγματα. Το πρώτο από τα δύο υποδείγματα από την περιοχή του Λασιθίου έμεινε όπως ήταν (natural) και το δεύτερο αποστειρώθηκε με υποκαπνισμό με χλωροφόρμιο σύμφωνα με την διαδικασία που έχει περιγραφεί από τους Karpouzas et al. (1999) με μια μόνο μεταβολή (fumigated) στην διαδικασία: Τα δείγματα του εδάφους εκτέθηκαν σε χλωροφόρμιο σε ξηραντήρα για διάστημα 5 ημερών, ακολούθησε απομάκρυνση από τον ξηραντήρα και επώαση για 5 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επαναπτυχθούν μικροοργανισμοί που επεβίωσαν κατά την πρώτη περίοδο έκθεσης χλωροφόρμιο, και στην συνέχεια τα εδάφη επανατοποθετήθηκαν για 5 ημέρες σε ξηραντήρα με χλωροφόρμιο ώστε να υπάρξει πλήρης και ολοκληρωτική απομάκρυνση των μικροοργανισμών.

Αντίστοιχα για τα υποδείγματα από τα εδάφη από τα Μάλια: Το πρώτο έμεινε ως έχει (non fumigated), το δεύτερο αποστειρώθηκε με χλωροφόρμιο όπως περιγράφεται παραπάνω (fumigated), το τρίτο αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο (autoclaved) (2 x 15 min, 120°C) ενώ το τέταρτο αφού αποστειρώθηκε με αυτόκαυστο στην συνέχεια εμβολιάστηκε με μικρή ποσότητα φρέσκου εδάφους (1% κατά βάρος) και αφέθηκε να επωαστεί για διάστημα 10 ημερών (autoclaved inoculated). Με την διαδικασία αυτή το εμβολιασμένο έδαφος μπορεί να θεωρηθεί ως 'απόλυτος βιολογικός μάρτυρας' του εδάφους που αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο ώστε να ελεγχθεί η συμμετοχή της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους των Μαλίων στην διάσπαση του oxamyl.

2.2. Μετρήσεις εδαφολογικών χαρακτηριστικών

Ένα μέρος κάθε δείγματος, από τα 12 συνολικά δείγματα (10 από την περιοχή του Λασιθίου και 2 από την περιοχή των Μαλίων) μετά την απομάκρυνση ξένων υλών χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μετρήθηκαν είναι:

- Περικτικότητα σε οργανική ουσία
- pH
- Υδατοχωρητικότητα
- Υγρασία

2.2.1 Προσδιορισμός της οργανικής ουσίας των εδαφών

Η περιεχόμενη στο έδαφος οργανική ουσία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της υγρής καύσης. Το ποσοστό του οργανικού άνθρακα στην περίπτωση αυτή προσδιοριζόταν με τη μέθοδο της υγρής καύσης (οξειδωση με διχρωμικό κάλιο παρουσία θειικού οξέος) (Allison, 1965). Για τη μετατροπή των αποτελεσμάτων σε ποσοστό οργανικής ουσίας τα ποσοστά οργανικού άνθρακα πολλαπλασιάζονταν με το συντελεστή μετατροπής 1.724 (Nelson και Sommers, 1982).

2.2.2 Προσδιορισμός του pH των εδαφών

Το pH του εδάφους των δειγμάτων προσδιοριζόταν σε μείγμα με αναλογία εδάφους : νερού 1:2 με προσθήκη 20 ml νερού σε 10 g αεροξηραμένου εδάφους σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml . Η μέτρηση του pH γινόταν με τη χρήση pH-meter υψηλής ανάλυσης (Crison 2002) και ηλεκτρόδιο Mettler, ενώ κατά την πορεία της μέτρησης τα δείγματα αναδεύονταν με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.

2.2.3 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών

Ο προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας (WHC) του εδάφους των δειγμάτων έγινε με κορεσμό μιας ποσότητας δείγματος εδάφους. Πιο συγκεκριμένα σε πλαστικό χωνί τοποθετήθηκε διηθητικό χαρτί και αφού ζυγίστηκαν 20 g κοσκινισμένου εδάφους, ακολουθούσε κατάκλιση με σταδιακή προσθήκη απιονισμένου νερού με μικρή ροή, με προσοχή ώστε να μην διαταράζονταν το περιεχόμενο έδαφος και να μην υπάρξει διαρροή νερού από το σημείο επαφής του διηθητικού χαρτιού και του τοιχώματος του χωνιού. Στη συνέχεια το χωνί σκεπάζονταν με χαρτί για την αποφυγή απώλειας νερού λόγω εξάτμισης και μετά από την στράγγιση της περίσσειας νερού μετά από 12 ώρες, προσδιοριζόταν η υδατοχωρητικότητα με αφαίρεση του αρχικού

βάρους των εδαφών, από το βάρος του δείγματος, μετά τον κορεσμό με νερό.
Η υδατοχωρητικότητα προσδιορίζεται από την εξίσωση:

Υδατοχωρητικότητα (WHC)= $(20-x)+(W2-W1)/x$, όπου

x= η ποσότητα ξηρού εδάφους στα 20 g φρέσκου εδάφους που προσδιορίζεται προηγουμένως με μέτρηση της υγρασίας του και W1 και W2 το βάρος του χωνιού, χαρτιού και εδάφους πριν και μετά την κατάκλιση.

2.2.4 Προσδιορισμός της υγρασίας των εδαφών

Η υγρασία των εδαφών προσδιορίστηκε με θέρμανση προζυγισμένων ποσοτήτων εδάφους στους 110°C για 24 ώρες και ζύγιση τους μετά την θέρμανση. Για κάθε δείγμα προετοιμάστηκαν δύο επαναλήψεις

Η υγρασία του εδάφους προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

MC= $[(W1-W2)*100%]/(W1-W_{cont})$, όπου

MC: η υγρασία του εδάφους

W1: το βάρος του δοχείου με το έδαφος πριν την ξήρανση

W2: το βάρος του δοχείου με το έδαφος μετά την ξήρανση

W_{cont} : το βάρος του δοχείου

2.3. Μέθοδος ανάλυσης των υπολειμμάτων του oxamyl

2.3.1. Υγρή Χρωματογραφία

Για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του oxamyl αλλά και του κύριου μεταβολίτη του oxamyl oxime χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σύστημα HPLC Marathon III, που ήταν εξοπλισμένο με

σύστημα αντλιών βαθμιδωτής έκλουσης, όγκο έγχυσης 20 μL και ανιχνευτή UV, ενώ ήταν συνδεδεμένο με ανάλογο λογισμικό Clarify® για την παραλαβή και επεξεργασία των δεδομένων. Ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης (RP) C18, Nucleosil (150 x 4.6 mm, 5 μm id) (Macherey – Nagel GmbH, Germany). Πιο συγκεκριμένα ο διαχωρισμός των oxamyl και oxamyl oxime έγινε με ισοκρατική έκλουση σε κινητή φάση 20 % ACN: 80 % H_2O . Η ανίχνευσή τους πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 220 nm και οι χρόνοι κατακράτησης των oxamyl και oxamyl oxime ήταν 3,3 min και 2,3 min αντίστοιχα.

2.3.2. Διαλύτες και γεωργικά φάρμακα

Για την προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων και κινητής φάσης για τη χρωματογραφική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη (MeOH), ακετονιτρίλιο (ACN) και νερό HPLC grade (Merck GmbH, Germany). Για την ανάλυση και τον περαιτέρω πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικά πρότυπα oxamyl (99.6%, Fluka, Ελβετία) και oxamyl oxime (100% DuPont, ΗΠΑ) .

2.3.3. Καμπύλες αναφοράς

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του oxamyl, καθώς και του προϊόντος μεταβολισμού του oxamyl oxime πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για τον λόγο αυτό, αρχικά παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα 1000 $\mu\text{g/mL}$ σε μεθανόλη για το oxamyl και για το oxamyl oxime. Ακολούθως, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 10, 5, 2, 1, 0,5 και 0,1 $\mu\text{g/mL}$ με διαδοχικές αραιώσεις στο διάλυμα της κινητής φάσης (20 % ACN:80 % H_2O κ.ο.) και έγινε έγχυση 20 μL από το κάθε ένα στο σύστημα HPLC. Το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Ο ποσοτικός προσδιορισμός

πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του εμβαδού των κορυφών τους με την βοήθεια του λογισμικού Clarify®.

2.3.4 Μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων oxamyl και oxamyl oxime σε δείγματα εδάφους

Η εκχύλιση του oxamyl αλλά και του κύριου προϊόντος μεταβολισμού του, oxamyl oxime από το έδαφος πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται παρακάτω: Αρχικά ποσότητα 10 g εδάφους ζυγίστηκε σε κωνικές φιάλες των 100 mL και προστέθηκαν 20 mL μίγματος ακετονιτριλίου (ACN) - νερού HPLC grade (Merck GmbH, Germany) σε αναλογία 50 % ACN : 50 % H₂O. Οι φιάλες ανακινήθηκαν για 1 ώρα και 30 λεπτά σε μέτρια ταχύτητα σε οριζόντιο αναδευτήρα. Μετά τη ανάδευση το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 7500 στροφές/min. Στη συνέχεια το καθαρό υπερκείμενο διηθούνταν από φίλτρο Whatman No 3 και το διήθημα μεταφέρονταν σε φιαλίδια HPLC (1.8 ml) για ανάλυση σε σύστημα HPLC-UV όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Η μέθοδος εκχύλισης που αναπτύχθηκε δοκιμάστηκε ως προς την επαναληψιμότητα και ακρίβεια μέτρησης στα επίπεδα των 0,2, 2 και 10 mg/Kg σε δείγμα εδάφους. Τα μέσα ποσοστά ανάκτησης (τρεις επαναλήψεις ανά επίπεδο φόρτισης) ήταν 90,9% , 92,5% και 99,2% αντίστοιχα.

2.4. Μελέτη της αποδόμησης του oxamyl στα δείγματα εδάφους

Για την μελέτη της αποδόμησης και μεταβολισμού του oxamyl στα διάφορα εδάφη χρησιμοποιήθηκαν 150 g από κάθε έδαφος-μεταχείριση (5 χρόνοι δειγματοληψίας x 3 επαναλήψεις x 10 g για κάθε επανάληψη). Αρχικά το κάθε δείγμα-μεταχείριση εδάφους διαχωρίστηκε σε 15 υπο-δείγματα των 10 g στα οποία έγινε εφαρμογή κατάλληλης ποσότητας υδατικού διαλύματος oxamyl (240 mg/L) ώστε στο έδαφος να υπάρξει συγκέντρωση 10 µg oxamyl/g ξηρού βάρους εδάφους. Μετά την εφαρμογή ακολούθησε προσθήκη

νερού ώστε η υγρασία του εδάφους να προσαρμοστεί στο 40 % της υδατοχωρητικότητας. Στην συνέχεια έγινε ανάμιξη ώστε να επέλθει ομοιόμορφη κατανομή του γεωργικού φαρμάκου στα δείγματα εδάφους. Μετά την εφαρμογή και την ανάδευση και πριν την μεταφορά των δειγμάτων στο θάλαμο επώασης (25°C), έγινε η πρώτη δειγματοληψία (3 x 10 g για κάθε συνδυασμό έδαφος – μεταχείριση) που αντιστοιχούσε στη χρονική στιγμή μηδέν αμέσως μετά την εφαρμογή του oxamyl. Ακολούθως όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες με αεροστεγές κλείσιμο οι οποίες τρυπήθηκαν σε ένα σημείο ώστε να είμαστε σίγουροι για την διατήρηση των αερόβιων συνθηκών στα εδάφη. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στο θάλαμο επώασης στους 25°C. Στις 3, 7, 14 και 30 ημέρες μετά την εφαρμογή του oxamyl τρία υποδείγματα (10 g) συλλέχθηκαν από κάθε έδαφος-μεταχείριση, τοποθετούνταν σε πλαστικές σακούλες και αποθηκεύονταν σε κατάψυξη μέχρι την ανάλυσή τους.

2.5. Στατιστική επεξεργασία

Τα δεδομένα αποδόμησης του oxamyl στα διάφορα εδάφη στον χρόνο χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του χρόνου ημιζωής χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα FOCUSDegKin (FOCUS 2006). Σε όλες τις περιπτώσεις στα δεδομένα προσαρμόστηκε το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (First Order Kinetics, FOK) όπως περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$C = C_0 e^{-kt}$$

Και οι τιμές DT50 του oxamyl στα διάφορα εδάφη υπολογίστηκαν με την παρακάτω εξίσωση

$$DT50 = \ln 2/k$$

Η επιτυχής προσαρμογή των δεδομένων στο μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης αξιολογήθηκε μέσω υπολογισμού του συντελεστή χ^2 (%) σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\chi^2 = \frac{\sum (C - \bar{O})^2}{\sum (err / 100 \bar{O})^2}$$

Όπου C = υπολογιζόμενη τιμή, O = πειραματική τιμή, \bar{O} = μέσος όρος πειραματικών τιμών και *err* = σφάλμα. Ο συντελεστής χ^2 αποτελεί μέτρο της ακρίβειας με την οποία το μοντέλο κινητικής περιγράφει τα πειραματικά δεδομένα και θεωρείται ότι τιμές > 15% υποδηλώνουν χαμηλή συμφωνία μεταξύ μοντέλου και πειραματικών δεδομένων.

Πιθανές σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ DT50, φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εδάφους ή άλλων παραμέτρων (ιστορικό χρήσης oxamyl) προσδιορίστηκαν με βάση τον συντελεστή συσχέτισης Pearsons. Η επίδραση του ιστορικού χρήσης oxamyl και της αποστείρωσης στην αποδόμηση του oxamyl στα διάφορα εδάφη αξιολογήθηκαν με one-way ANOVA. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS 16.0v.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Εδαφολογικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα κυριότερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (pH και περιεκτικότητα σε οργανική ουσία) των δειγμάτων εδάφους που μελετήθηκαν. Τα εδάφη παρουσιάζονται όξινα έως πολύ όξινα, εκτός από τα δύο εδάφη από την περιοχή των Μαλίων που είναι ελαφρώς αλκαλικά και το έδαφος Λασίθι 2 που παρουσιάζει ουδέτερη τιμή pH. Η περιεκτικότητα των εδαφών σε οργανική ουσία είναι γενικά υψηλότερη από την μέση τιμή των εδαφών στην Ελλάδα (>1,8% σε όλα τα δείγματα) κάτι που πιθανότατα οφείλεται στην ετήσια προσθήκη οργανικής λίπανσης από τους παραγωγούς της περιοχής.

Πίνακας 2: Το pH και η περιεκτικότητα σε οργανική ουσία των εδαφών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Έδαφος	pH	Οργανική Ουσία %
Λασίθι 2	6,93	1,83
Λασίθι 4	4,85	2,54
Λασίθι 5	5,48	2,51
Λασίθι 6	4,81	3,46
Λασίθι 7	5,07	2,14
Λασίθι 8	4,06	2,97
Λασίθι 9	5,2	3,51
Λασίθι 10	4,25	3,21
Λασίθι 11	4,52	2,02
Λασίθι 12	4,14	2,72
Μάλια ελιά	7,45	2,80

Μάλια μπανάνα	7,74	1,80
---------------	------	------

3.2. Αποδόμηση oxamyl

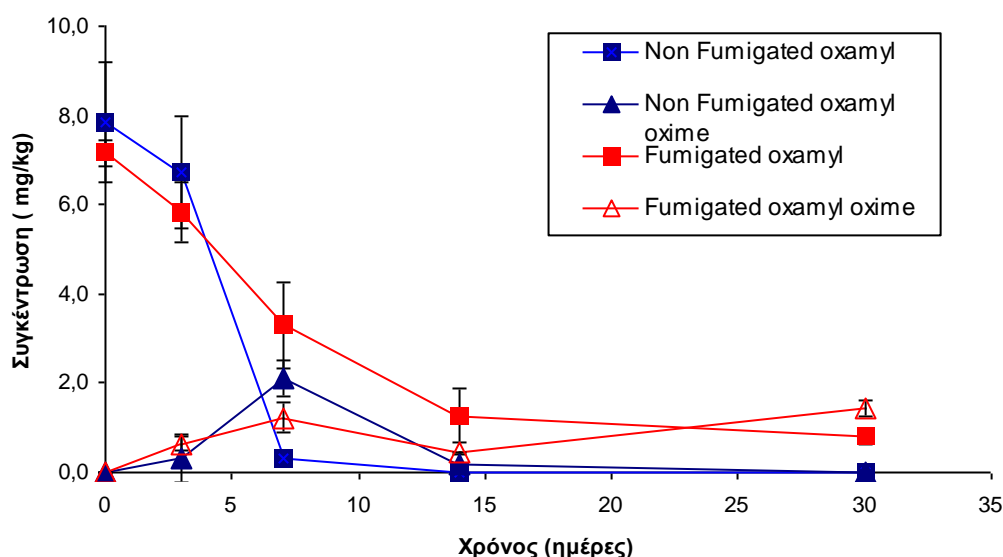
3.2.1. Απόδομηση του oxamyl σε εδάφη από πατατοκαλλιέργεια της περιοχής Λασιθίου

Στα Διαγράμματα 3.1 ως 3.10 παρουσιάζεται η κινητική αποδόμησης του oxamyl καθώς και ο σχηματισμός του μεταβολίτη oxime σε όλα τα δείγματα εδάφους από την περιοχή του Λασιθίου. Αντίστοιχα στον Πίνακα 3 παρατίθενται οι τιμές του χρόνου ημιζωής για το oxamyl.

Πίνακας 3. Ο χρόνος ημιζωής (DT₅₀) και ο ρυθμός διάσπασης (k) του oxamyl στα δείγματα εδάφους από το Λασίθι όπως υπολογίστηκαν ύστερα από προσαρμογή των δεδομένων διάσπασης σε μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (FOK). Επίσης παρουσιάζεται και ο συντελεστής χ² που αποτελεί δείκτη προσαρμογής των δεδομένων στο μοντέλο κινητικής.

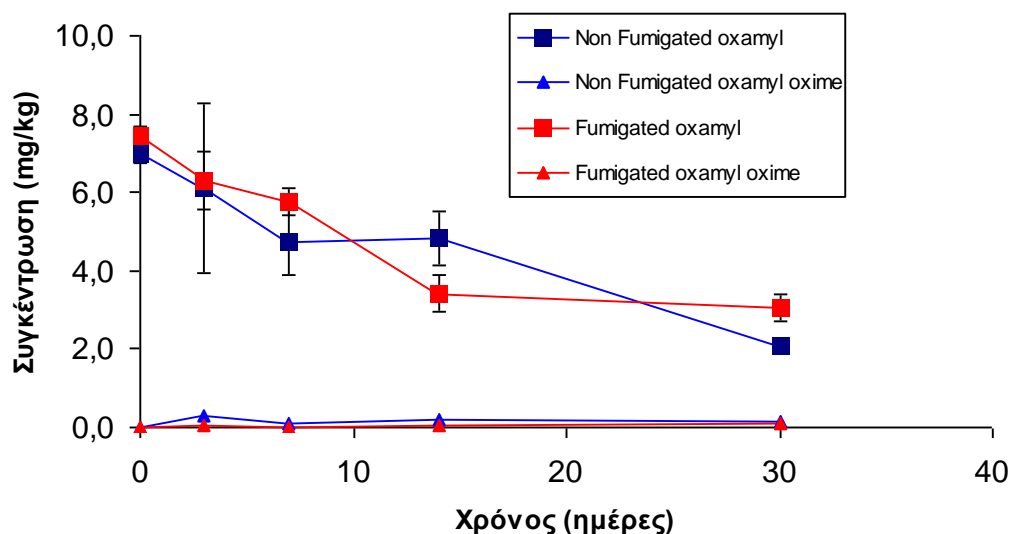
Δείγματα	DT ₅₀ (ημέρες)	k (1/ημέρα)	χ ² (%)
Λασίθι 2	3,4	0,201	34
Λασίθι 2 Fumigated	6,4	0,108	8,3
Λασίθι 4	19,2	0,036	6,9
Λασίθι 4 Fumigated	18,9	0,037	7,9
Λασίθι 5	3,9	0,18	14,3
Λασίθι 5 Fumigated	38	0,018	5,9
Λασίθι 6	8,3	0,083	11,8
Λασίθι 6 Fumigated	22,2	0,031	9,5
Λασίθι 7	21,1	0,033	7,2
Λασίθι 7 Fumigated	11,8	0,059	18,1
Λασίθι 8	17,1	0,041	5,8
Λασίθι 8 Fumigated	4,7	0,148	11,5
Λασίθι 9	8	0,087	13,6
Λασίθι 9 Fumigated	9,5	0,073	9
Λασίθι 10	14,5	0,048	13,5
Λασίθι 10 Fumigated	11,6	0,06	13,9

Λασίθι 11	10	0,069	5
Λασίθι 11 Fumigated	11	0,063	15
Λασίθι 12	26	0,027	5
Λασίθι 12 Fumigated	16,6	0,042	6,4



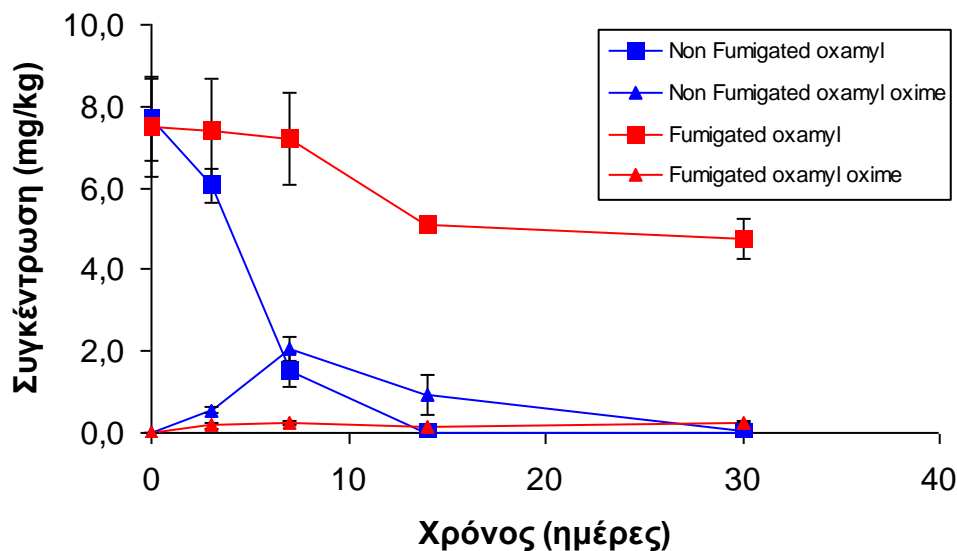
Διάγραμμα 3.1 Η αποδόμηση του oxamyl και ο σχηματισμός του μεταβολίτη oxamyl oxime στο έδαφος Λασίθι 2 (fumigated και non fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Στο έδαφος Λασίθι 2, το οποίο δεν έχει ιστορικό χρήσης oxamyl (pH:6,93 και περιεκτικότητα σε οργανική ουσία:1,83%) παρατηρείται μια καθυστέρηση στην αποδόμηση του oxamyl στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή χλωροφορμίου (fumigated) σε σχέση με τα μη αποστειρωμένα δείγματα, ειδικότερα μετά τις πρώτες 7 ημέρες. Έτσι στην πρώτη μεταχείριση (fumigated) παρατηρήθηκε διάσπαση του 54% του oxamyl κατά τις πρώτες 7 ημέρες ενώ στο ίδιο διάστημα στην δεύτερη μεταχείριση το ποσοστό διάσπαση ήταν 95,8% (Διάγραμμα 3.1). Η διαφορά αυτή αποτυπώνεται και στους χρόνους ημιζωής στα δύο δείγματα που ήταν 3.4 (non fumigated) και 6.4 ημέρες (fumigated) (Πίνακας 3). Η αποδόμηση του oxamyl συνοδεύτηκε από σχηματισμό oxamyl oxime με μέγιστες τιμές να καταγράφονται στα μη αποστειρωμένα δείγματα 7 ημέρες μετά την εφαρμογή.



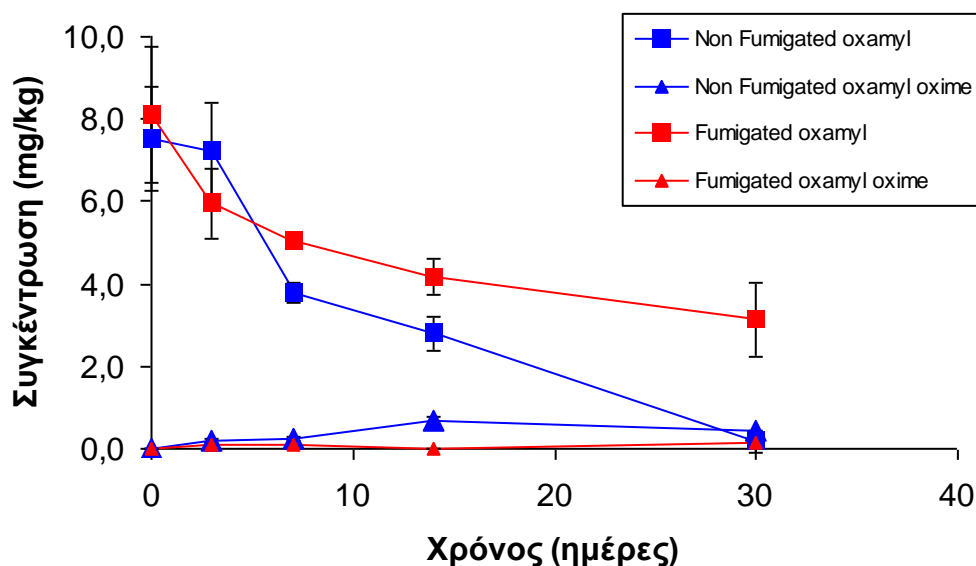
Διάγραμμα 3.2: Η αποδόμηση του oxamyl και ο σχηματισμός του μεταβολίτη oxamyl oxime στο έδαφος Λασιθί 4 (fumigated και non fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Στο έδαφος Λασιθί 4, το οποίο δεν είχε ιστορικό χρήσης oxamyl και παρουσίαζε όξινο pH: 4,85 και σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία (2,54%) παρατηρήθηκε σχετικά βραδεία αποδόμηση του oxamyl ανεξάρτητα από την εφαρμογή αποστείρωσης ή όχι (Διάγραμμα 3.2). Παράλληλα σχηματίστηκαν ελάχιστες ποσότητες oxamyl oxime κατά την διάρκεια του πειράματος. Τα παραπάνω αποτυπώνονται και στους χρόνους ημιζωής που ήταν 18,9 και 19,2 ημέρες για τα αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα εδάφη αντίστοιχα (Πίνακας 3).



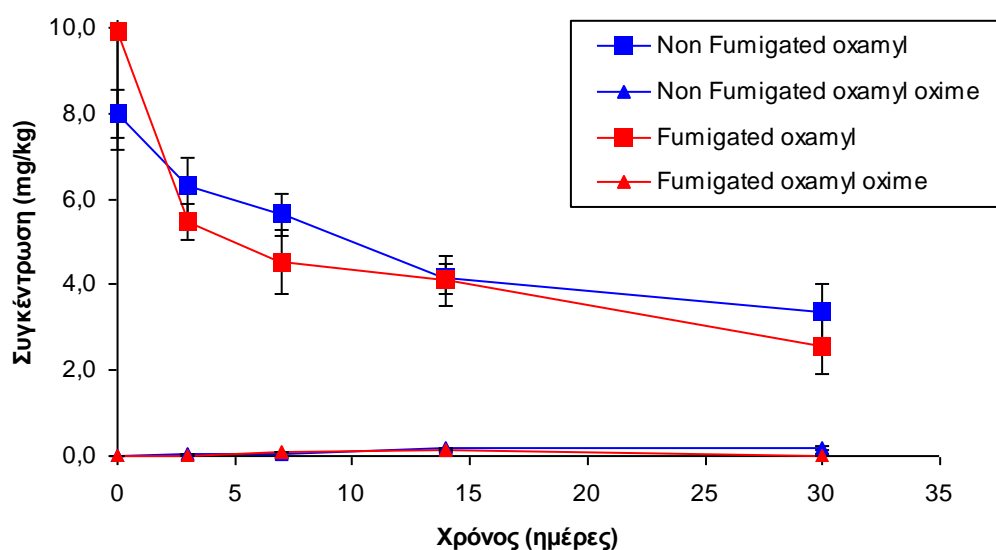
Διάγραμμα 3.3: Η αποδόμηση του oxamyl και ο σχηματισμός του μεταβολίτη oxamyl oxime στο έδαφος Λασίθι 5 (fumigated και non fumigated). Κάθε τιμή αποτελεί τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Το έδαφος Λασίθι 5 με ιστορικό χρήσης oxamyl, σχετικά χαμηλό pH (5,48) και περιεκτικότητα σε οργανική ουσία 2,51%, αποτελεί την πιο χαρακτηριστική περίπτωση μικροβιακής διάσπασης στην παρούσα μελέτη. Έτσι ο χρόνος ημιζωής του oxamyl στο αποστειρωμένο και στο μη αποστειρωμένο έδαφος ήταν 38 και 3,9 ημέρες αντίστοιχα (Διάγραμμα 3.3.). Η ταχεία αποδόμηση του oxamyl στο μη-αποστειρωμένο έδαφος συνδυάστηκε με το σχηματισμό oxamyl oxime (μέγιστη συγκέντρωση στις 7 ημέρες) το οποίο διασπάστηκε στην συνέχεια. Αντίθετα χαμηλές συγκεντρώσεις oxamyl σχηματίστηκαν στο αποστειρωμένο έδαφος. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν ένδειξη για την εμφάνιση επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης στο συγκεκριμένο έδαφος που χαρακτηρίζεται από όξινο προς ουδέτερο pH.



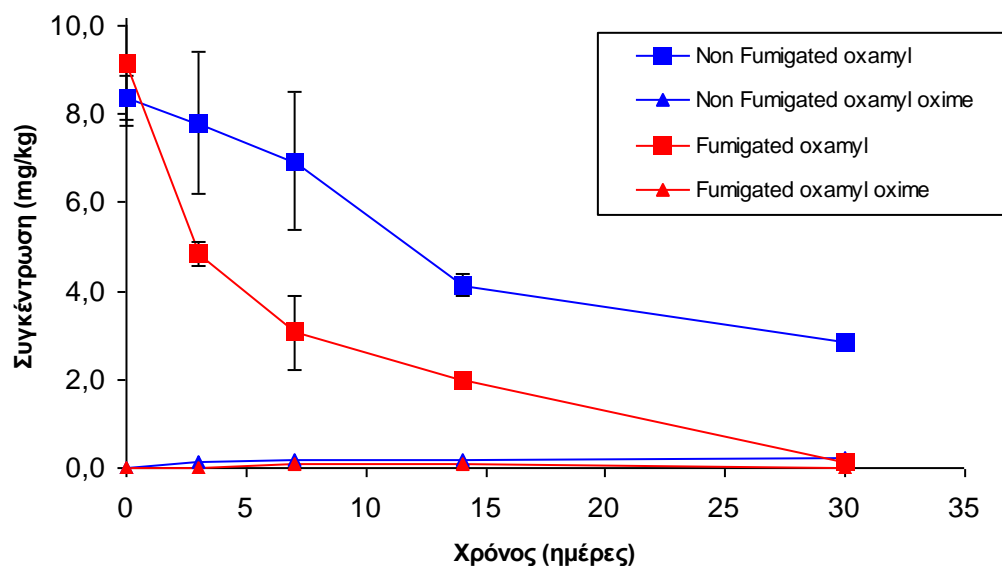
Διάγραμμα 3.4: Η αποδόμηση του oxamyl και ο σχηματισμός του μεταβολίτη oxamyl oxime στο έδαφος Λασίθι 6 (fumigated και non fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Στο έδαφος Λασίθι 6, το οποίο είχε ιστορικό χρήσης oxamyl και χαρακτηρίζεται από όξινο pH (4,81) και υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία (3,46%) παρατηρήθηκε μια διαφορά στο ρυθμό αποδόμησης του oxamyl μεταξύ αποστειρωμένων και μη αποστειρωμένων δειγμάτων (Διάγραμμα 3.4). Έτσι στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή χλωροφορμίου ο χρόνος ημιζωής του oxamyl ήταν 22.2 ημέρες αντίθετα με την ταχύτερη αποδόμηση που παρατηρήθηκε στο μη αποστειρωμένο δείγμα με χρόνο ημιζωής 8,3 ημέρες. Και στα δύο εδάφη παρατηρήθηκε περιορισμένος σχηματισμός oxamyl oxime με χαμηλότερες τιμές να καταγράφονται σε όλη την διάρκεια του πειράματος στο αποστειρωμένο με χλωροφόρμιο δείγμα.



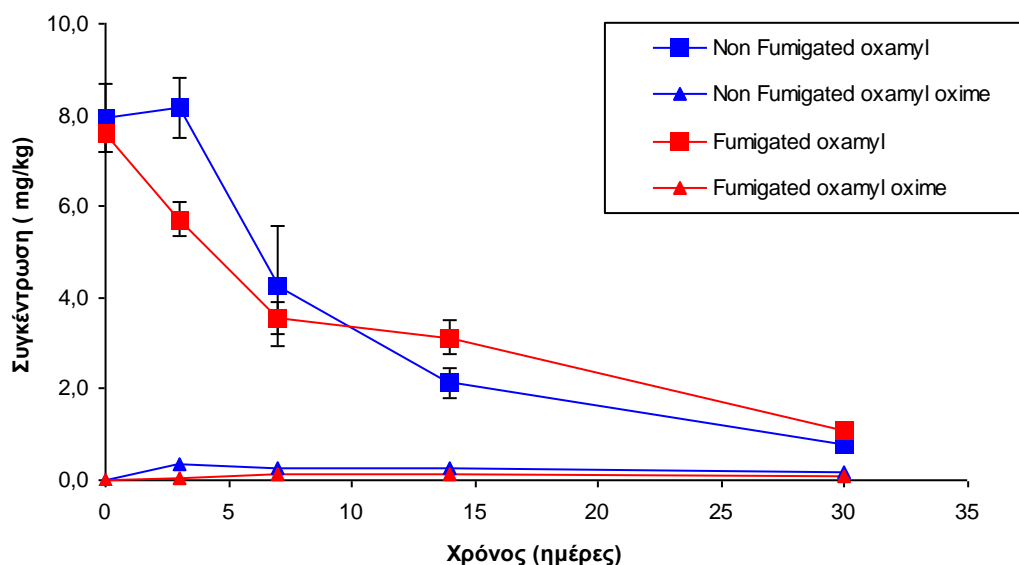
Διάγραμμα 3.5: Η αποδόμηση του oxamyl και ο σχηματισμός oxamyl oxime στο έδαφος Λασίθι 7 (fumigated και non fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Στο έδαφος Λασίθι 7 που είχε ιστορικό χρήσης oxamyl, pH: 5,07 και περιεκτικότητα σε οργανική ουσία: 2,14% παρατηρήθηκε ταχύτερος ρυθμός διάσπασης του νηματωδοκτόνου στο αποστειρωμένο με χλωροφόρμιο δείγμα σε σχέση με το μη αποστειρωμένο (Διάγραμμα 3.5) με χρόνους ημιζωής 12 και 21 ημέρες αντίστοιχα (Πίνακας 3). Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης δεν περιέγραψε με απόλυτη ακρίβεια την αποδόμηση του oxamyl στο αποστειρωμένο με χλωροφόρμιο δείγμα του εδάφους Λασίθι 7 όπως φαίνεται από την τιμή του $\chi^2 > 15\%$ (Πίνακας 3). Η βραδεία διάσπαση του oxamyl συνοδεύτηκε από σχηματισμό μικρών ποσοτήτων oxamyl oxime και στα δύο δείγματα.



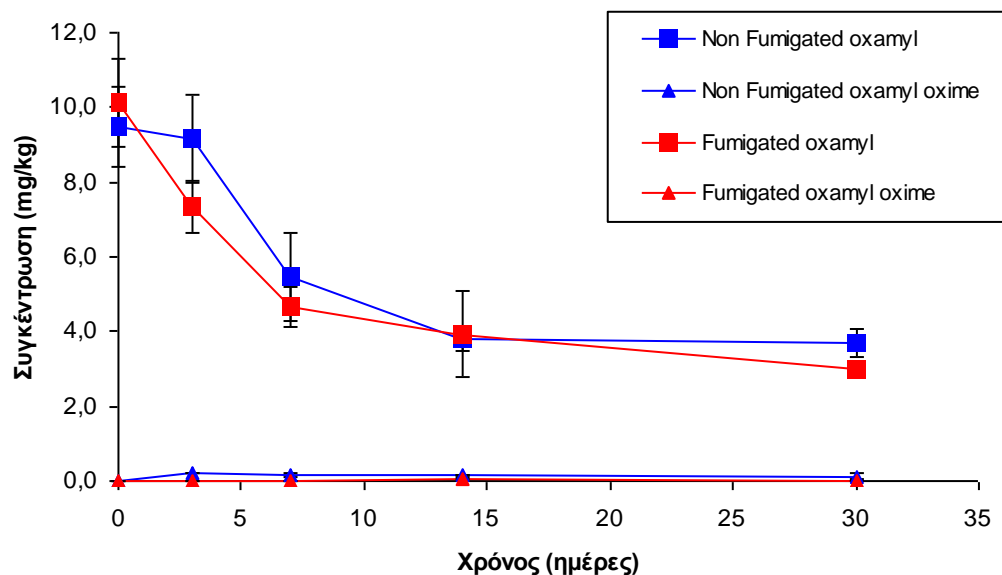
Διάγραμμα 3.6: Η αποδόμηση του oxamyl και ο σχηματισμός του μεταβολίτη oxamyl oxime στο έδαφος Λασίθι 8 (fumigated και non fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Στο έδαφος Λασίθι 8 χωρίς ιστορικό χρήσης του oxamyl, που χαρακτηρίζεται από όξινο pH (4,06) και σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία (2,97%) παρατηρήθηκε ταχύτερη διάσπαση του oxamyl στα αποστειρωμένα με χλωροφόρμιο δείγματα σε σύγκριση με τα μη αποστειρωμένα (Διάγραμμα 3.6). Αυτή η εικόνα αντικατοπτρίζεται και στους χρόνους ημιζωής που για τις δύο αυτές μεταχειρίσεις ήταν 4,7 και 17,1 ημέρες αντίστοιχα. Η διάσπαση του oxamyl συνοδεύτηκε από σχηματισμό μικρών ποσοτήτων oxamyl oxime και στα δύο δείγματα.



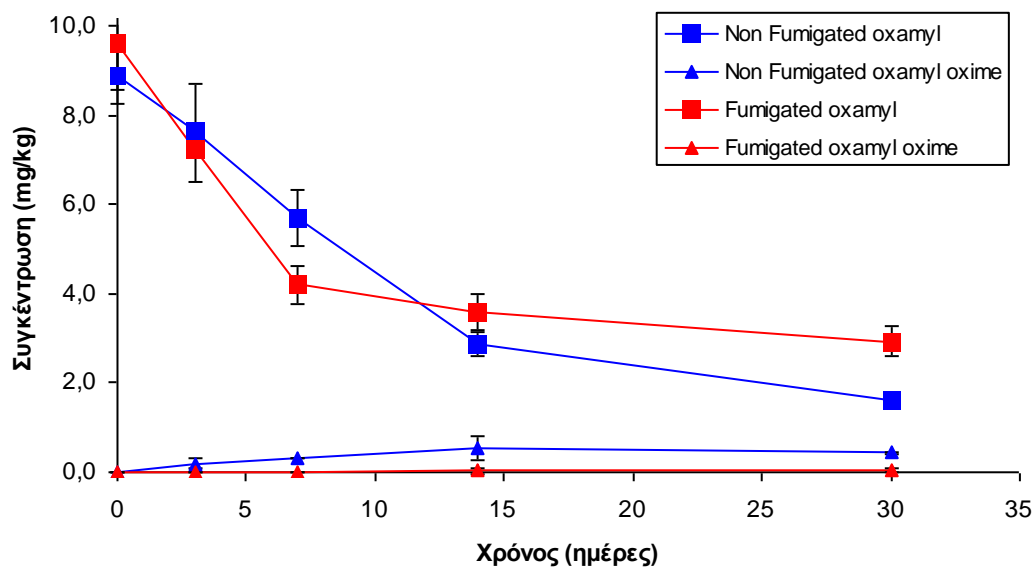
Διάγραμμα 3.7: Η αποδόμηση του oxamyl και ο σχηματισμός oxamyl oxime στο έδαφος Λασίθι 9 (fumigated και non fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Στο έδαφος Λασίθι 9 με ιστορικό χρήσης του oxamyl, pH: 5,2 και οργανική ουσία: 3,51% παρατηρήθηκαν παρόμοιοι ρυθμοί διάσπασης του oxamyl μεταξύ των αποστειρωμένων με χλωροφόρμιο και των μη αποστειρωμένων δειγμάτων με χρόνους ημιζωής 9,5 και 8 ημέρες αντίστοιχα. Αντίστοιχα και στις δύο μεταχειρίσεις ανιχνεύθηκαν μικρές συγκεντρώσεις oxamyl oxime καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 3.7).



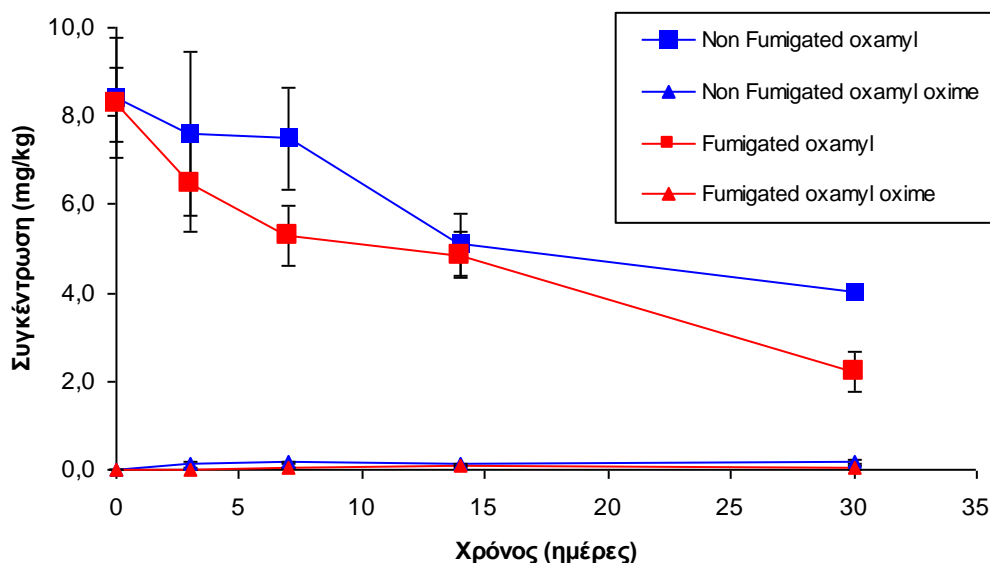
Διάγραμμα 3.8: Η αποδόμηση του oxamyl και ο σχηματισμός του oxamyl oxime στο έδαφος Λασίθι 10 (fumigated και non fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Στο έδαφος Λασίθι 10 με ιστορικό χρήσης oxamyl, ιδιαίτερα όξινο pH:4,25 και σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία: 3,21% παρατηρήθηκαν παρόμοιοι ρυθμοί διάσπασης στα αποστειρωμένα με χλωροφόρμιο και στα μη αποστειρωμένα δείγματα με χρόνους ημιζωής 11,6 και 14,6 ημέρες αντίστοιχα (Πίνακας 3). Και στις δύο μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε σχηματισμός ιδιαίτερα χαμηλών ποσοτήτων oxamyl oxime συμβαδίζοντας με τον χαμηλό ρυθμό διάσπασης του oxamyl στο συγκεκριμένο έδαφος (Διάγραμμα 3.8).



Διάγραμμα 3.9: Η αποδόμηση του oxamyl και ο σχηματισμός του oxamyl oxime στο έδαφος Λασίθι 11 (fumigated και non fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Στο έδαφος Λασίθι 11 με ιστορικό χρήσης του oxamyl, όξινο pH:4,52 και περιεκτικότητα σε οργανική ουσία 2,2% παρατηρήθηκαν παρόμοιοι ρυθμοί διάσπαση μεταξύ αποστειρωμένου και μη αποστειρωμένου δείγματος με χρόνους ημιζωής 11 και 10 ημέρες αντίστοιχα (Πίνακας 3). Η ελαφρώς ταχύτερη διάσπαση του oxamyl από τις 14 ημέρες και μετά στο μη αποστειρωμένο δείγμα οδήγησε και σε σχηματισμό αντίστοιχα υψηλότερης (σε σχέση με το αποστειρωμένο δείγμα) ποσότητας oxamyl oxime (Διάγραμμα 3.9).



Διάγραμμα 3.10: Η αποδόμηση του oxamyl και ο σχηματισμός oxamyl oxime στο έδαφος Λασίθι 12 (fumigated και non fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

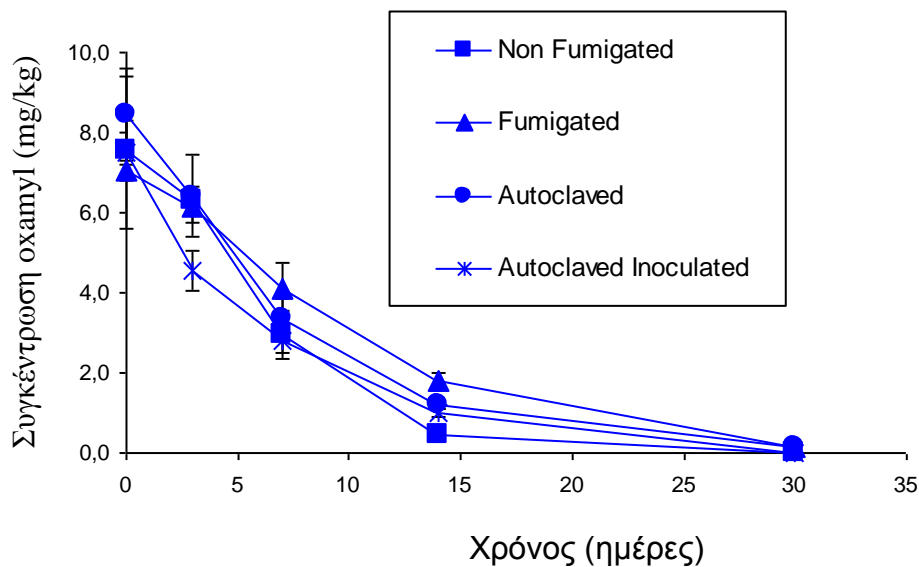
Στο δείγμα Λασίθι 12 με ιστορικό χρήσης του oxamyl, ιδιαίτερα όξινο pH (4,14) και μέτρια προς υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία (2,72%) παρατηρήθηκε ταχύτερη διάσπαση του oxamyl στα δείγματα που αποστειρώθηκαν με χλωροφόρμιο σε σχέση με τα μη αποστειρωμένα δείγματα (Διάγραμμα 3.10). Έτσι οι χρόνοι ημιζωής του oxamyl στα δύο δείγματα ήταν 16,6 και 26 ημέρες αντίστοιχα (Πίνακας 3). Και στις δύο μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε σχηματισμός ιδιαίτερα χαμηλών ποσοτήτων oxamyl oxime συμβαδίζοντας με τον χαμηλό ρυθμό διάσπασης του oxamyl στο συγκεκριμένο έδαφος.

3.2.2. Δείγματα από την περιοχή Μαλίων με καλλιέργειες ελιάς ή μπανάνας

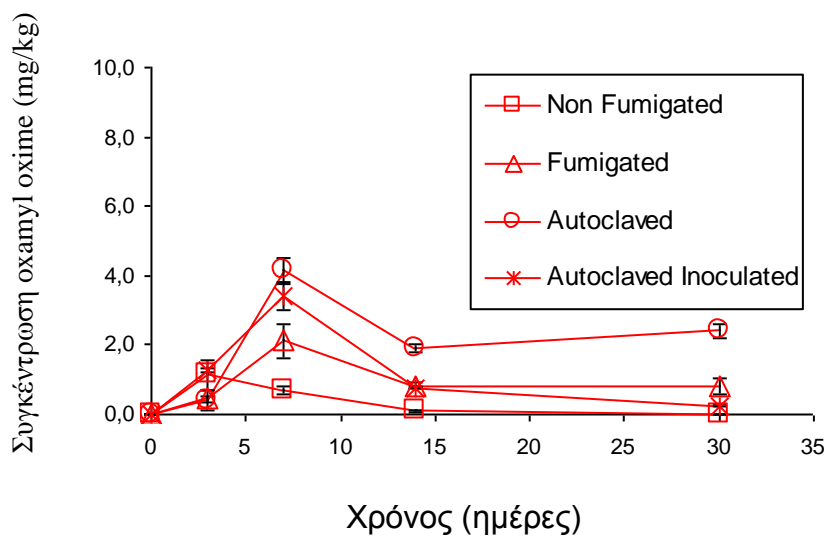
Στα Διαγράμματα 3.11 ως 3.16 παρουσιάζεται η κινητική αποδόμησης του oxamyl καθώς και ο σχηματισμός του μεταβολίτη oxamyl oxime σε όλα τα δείγματα εδάφους από την περιοχή των Μαλίων. Αντίστοιχα στον Πίνακα 4 παρατίθενται οι τιμές του χρόνου ημιζωής για το oxamyl.

Πίνακας 4: Ο χρόνος ημιζωής (DT50) και ο ρυθμός διάσπασης (k) του oxamyl στα διάφορα δείγματα εδάφους από την περιοχή των Μαλίων όπως υπολογίστηκαν ύστερα από προσαρμογή των δεδομένων διάσπασης σε μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (FOK). Επίσης παρουσιάζεται και ο συντελεστής χ^2 (%) που αποτελεί δείκτη καλής προσαρμογής των δεδομένων στο μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης.

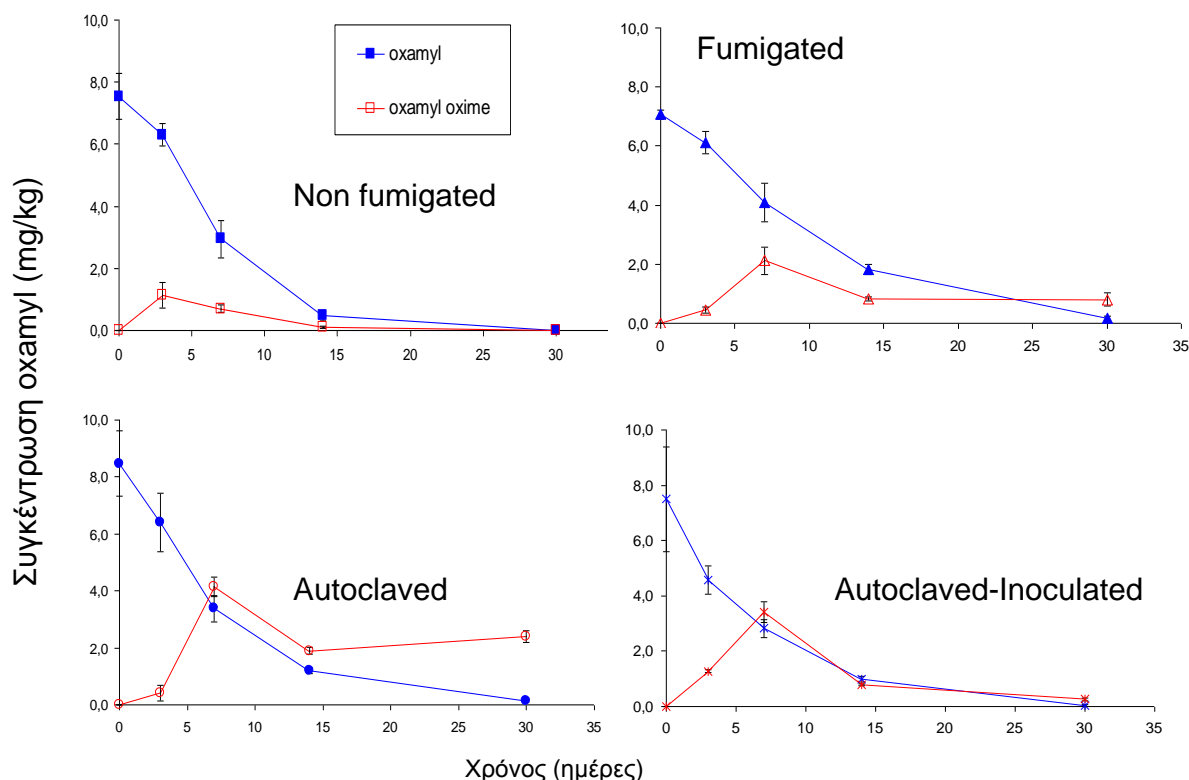
Δείγματα	DT50 (ημέρες)	K (1/ημέρα)	χ^2 (%)
Μάλια Ελιά	5,1	0,137	13,6
Μάλια Ελιά Fumigated	7,7	0,091	6,9
Μάλια Ελιά Autoclaved	5,4	0,129	5,6
Μάλια Ελιά Aut.-Inoc.	4,8	0,146	3,3
Μαλια Μπανάνα	3,9	0,178	15,1
Μαλια Μπαν. Fumigated	3,7	0,189	10,5
Μαλια Μπαν. Autoclaved	3,1	0,224	1,7
Μαλια Μπαν. Aut.-Inoc.	3,4	0,205	7,1



Διάγραμμα 3.11: Η αποδόμηση του oxamyl στα δείγματα εδάφους από αγρό της περιοχής Μαλίων με καλλιέργεια ελιάς τα οποία είτε αποστειρώθηκαν με χλωροφόρμιο (Fumigated) ή αυτόκαυστο (Autoclaved), είτε αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο και επανεμβολιάστηκαν με μικρή ποσότητα του ίδιου εδάφους (Autoclaved Inoculated) είτε παρέμειναν ως έχουν (Non Fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



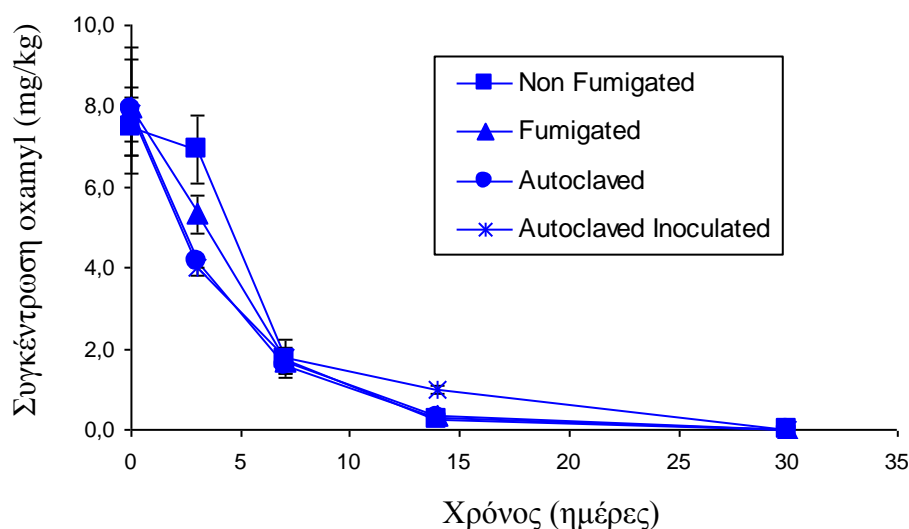
Διάγραμμα 3.12: Ο σχηματισμός του oxamyl oxime στα δείγματα εδάφους από αγρό της περιοχής Μαλίων με καλλιέργεια ελιάς τα οποία είτε αποστειρώθηκαν με χλωροφόρμιο (Fumigated) ή αυτόκαυστο (Autoclaved), είτε αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο και επανεμβολιάστηκαν με μικρή ποσότητα του ίδιου εδάφους (autoclaved inoculated) είτε παρέμειναν ως έχουν (non fumigated) . Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



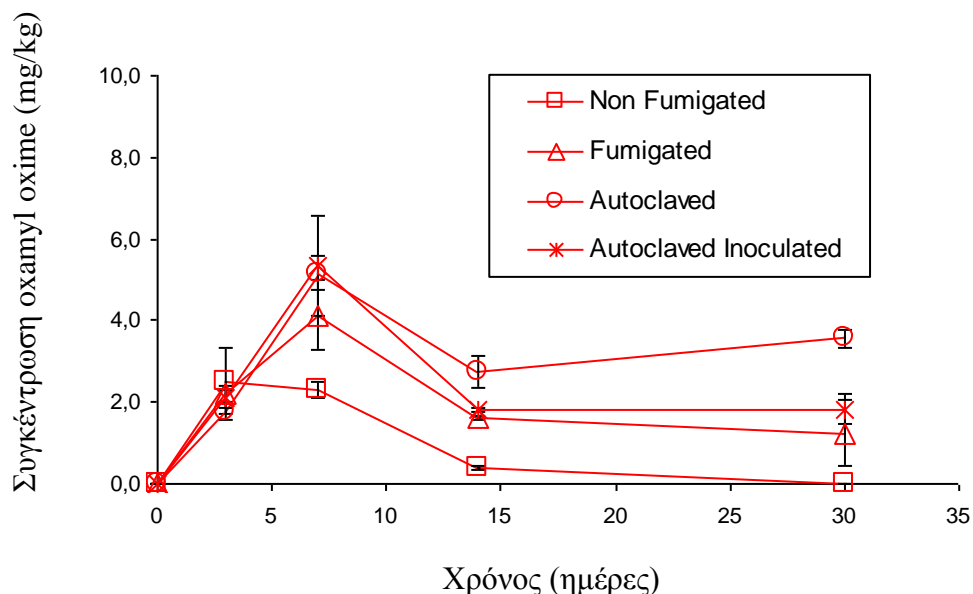
Σχήμα 3.13: Η αποδόμηση του oxamyl και ο σχηματισμός του μεταβολίτη oxamyl oxime σε έδαφος από ελαιοκαλλιέργεια της περιοχής Μαλίων που είτε αποστειρώθηκε με χλωροφόρμιο (Fumigated) ή αυτόκαυστο (Autoclaved), είτε αποστειρώθηκε με αυτόκαυστο και επανεμβολιάστηκε με το ίδιο έδαφος (Autoclaved inoculated), είτε παρέμεινε ως έχει (Non fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Στο έδαφος από την περιοχή των Μαλίων που υπήρχε καλλιέργεια ελιάς και συνεπώς δεν παρουσίαζε ιστορικό χρήσης oxamyl και χαρακτηρίζονται από αλκαλικό pH (7,45) και μέτρια προς υψηλή οργανική ουσία (2,8%) παρατηρήθηκε μια σχετικά ταχεία αποδόμηση του oxamyl σε όλες τις μεταχειρίσεις (Διάγραμμα 3.11 και 3.13) με χρόνους ημιζωής που κυμάνθηκαν από 4.8 ημέρες στο έδαφος που αποστειρώθηκε με αυτόκαυστο και επανεμβολιάστηκε με φρέσκο έδαφος ως και 7.7 ημέρες στο αποστειρωμένο με χλωροφόρμιο έδαφος (Πίνακας 4). Η ταχεία αποδόμηση του oxamyl στο συγκεκριμένο έδαφος ακόμη και στα αποστειρωμένα δείγματα (χλωροφόρμιο ή αυτόκαυστο) δείχνει ότι σε μεγάλο βαθμό η διάσπαση του oxamyl είναι αβιοτική λόγω του αλκαλικού pH του εδάφους που ευνοεί την υδρόλυση του συγκεκριμένου νηματωδοκτόνου. Η υψηλότερη ποσότητα oxamyl oxime ανιχνεύτηκε στο αποστειρωμένο με αυτόκαυστο δείγμα και ακολούθησαν τα

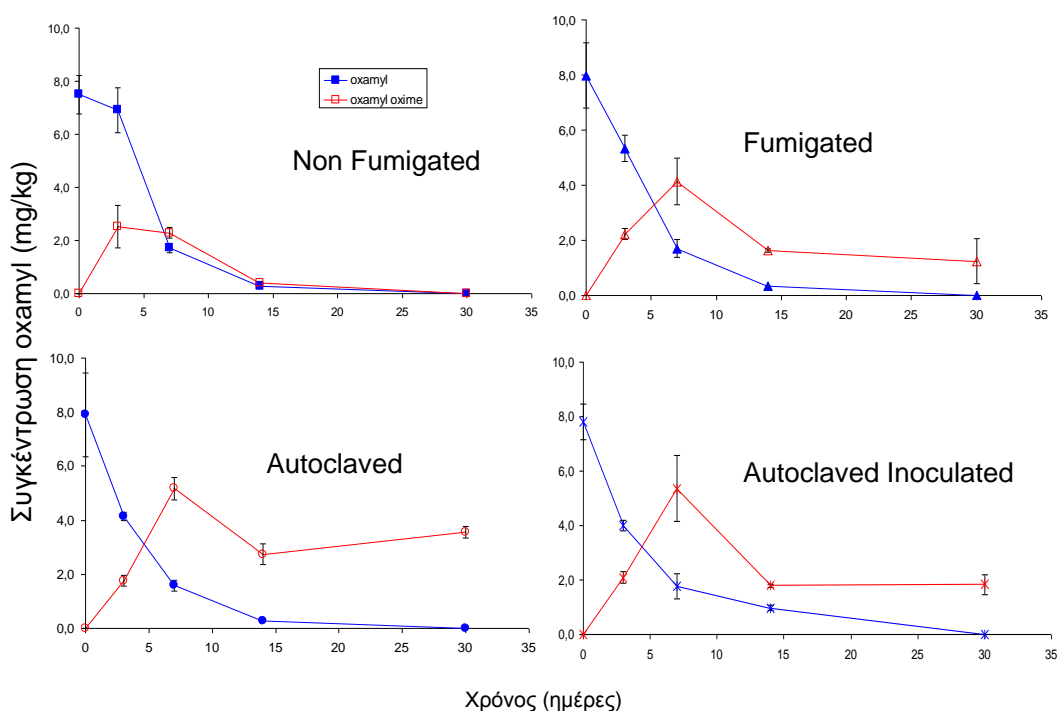
δείγματα που αποστειρώθηκαν στο αυτόκαυστο και επανεμβολιάστηκαν καθώς και τα δείγματα που αποστειρώθηκαν με χλωροφόρμιο (Διάγραμμα 3.12) Η συγκέντρωση του oxamyl oxime στα παραπάνω δείγματα παρουσίασε μέγιστη τιμή στις 7 ημέρες και ακολούθησε μια βραδεία αλλά όχι πλήρης διάσπαση στις 30 ημέρες. Αντίθετα στο μη αποστειρωμένο δείγμα η μέγιστη τιμή oxamyl oxime παρατηρήθηκε στις 3 ημέρες μετά την εφαρμογή και ακολούθως διασπάστηκε πλήρως.



Διάγραμμα 3.14: Η αποδόμηση του oxamyl στα δείγματα εδάφους από αγρό της περιοχής Μαλίων με καλλιέργεια μπανάνας τα οποία είτε αποστειρώθηκαν με χλωροφόρμιο (Fumigated) ή με αυτόκαυστο (Autoclaved), είτε αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο και επανεμβολιάστηκαν με μικρή ποσότητα του ίδιου εδάφους (Autoclaved Inoculated) είτε παρέμειναν ως έχουν (Non Fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.15: Ο σχηματισμός του oxamyl oxime στα δείγματα εδάφους από αγρό της περιοχής Μαλίων με καλλιέργεια μπανάνας τα οποία είτε αποστειρώθηκαν με χλωροφόρμιο (Fumigated) ή αυτόκαυστο (Autoclaved), είτε αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο και επανεμβολιάστηκαν με μικρή ποσότητα του ίδιου εδάφους (autoclaved inoculated) είτε παρέμειναν ως έχουν (non fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.16: Η αποδόμηση του oxamyl και ο σχηματισμός του μεταβολίτη oxamyl oxime σε έδαφος από μπανοκαλλιέργεια της περιοχής Μαλίων που είτε αποστειρώθηκε με χλωροφόρμιο (Fumigated) ή αυτόκαυστο (Autoclaved), είτε αποστειρώθηκε με αυτόκαυστο και επανεμβολιάστηκε με το ίδιο έδαφος (Autoclaved inoculated), είτε παρέμεινε ως έχει (Non fumigated). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Το έδαφος από την περιοχή Μαλίων με καλλιέργεια μπανάνας και ιστορικό χρήσης oxamyl χαρακτηρίζεται από αλκαλικό pH:7,74 και σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία (1,8%) σε σχέση με τα εδάφη από την περιοχή Λασιθίου. Σε αυτό το έδαφος παρατηρήθηκε παρόμοιο πρότυπο διάσπασης του oxamyl σε όλες τις μεταχειρίσεις ανεξάρτητα από την εφαρμογή αποστείρωσης (αυτόκαυστο ή χλωροφόρμιο) ή όχι (Διάγραμμα 3.14 και 3.16). Έτσι οι χρόνοι ημιζωής του oxamyl στα συγκεκριμένα δείγματα κυμάνθηκαν από 3,1 ημέρες στο αποστειρωμένο με αυτόκαυστο δείγμα ως και 3.9 ημέρες στο μη αποστειρωμένο έδαφος (Πίνακας 4). Αντίστοιχα, η υψηλότερη συγκέντρωση oxamyl oxime ανιχνεύτηκε στα αποστειρωμένα με

αυτόκαυστο δείγματα τα οποία είτε εμβολιάστηκαν είτε όχι με φρέσκο έδαφος και ακολούθησαν τα δείγματα που αποστειρώθηκαν με χλωροφόρμιο (Διάγραμμα 3.15). Η συγκέντρωση του oxamyl oxime στα παραπάνω δείγματα παρουσίασε μέγιστη τιμή στις 7 ημέρες και ακολούθησε μια βραδεία αλλά όχι πλήρης διάσπαση ως τις 30 ημέρες. Αντίθετα στο μη αποστειρωμένο δείγμα η μέγιστη τιμή oxamyl oxime παρατηρήθηκε στις 3 ημέρες μετά την εφαρμογή και ακολούθως διασπάστηκε πλήρως.

Συγκριτικά με το έδαφος από τα Μάλια χωρίς ιστορικό χρήσης oxamyl (Ελιά), στο παραπάνω έδαφος από την ίδια περιοχή με ιστορικό χρήσης oxamyl και παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά παρατηρήθηκε μια ελαφρώς ταχύτερη διάσπαση του oxamyl με αντίστοιχη παραγωγή υψηλότερων ποσοτήτων oxamyl oxime που διασπάστηκε περαιτέρω μόνο στα δείγματα που δεν αποστειρώθηκαν με κάποιο τρόπο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4.1. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αποδόμηση του oxamyl σε εδάφη από την Κρήτη με ή χωρίς ιστορικό χρήσης της συγκεκριμένης φυτοπροστατευτικής ουσίας καθώς και ο ακριβής μηχανισμός διάσπασης, βιοτικός ή αβιοτικός, του oxamyl στα συγκεκριμένα εδάφη. Γενικότερα, το oxamyl δεν παρουσίασε υψηλή υπολειμματικότητα σε κανένα από τα εδάφη που μελετήθηκαν με DT50 που κυμάνθηκαν από 3,4 ως 26 ημέρες. Οι τιμές αυτές συμφωνούν με τις τιμές DT50 που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία σε παρόμοιες μελέτες (Smelt et al., 1979, 1983, 1987; Gerstl, 1984; Bromilow et al 1980; Ambrose et al. 2000). Στην πιο πρόσφατη εργασία οι Osborn et al. (2010a) μελέτησαν την αποδόμηση του oxamyl σε δέκα διαφορετικά εδάφη και παρατήρησαν DT50 που κυμάνθηκαν από 1,1 ως 23,9 ημέρες.

Η διάσπαση του oxamyl σε όλα τα εδάφη συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό oxamyl oxime το οποίο στα περισσότερα εδάφη αποδομήθηκε περαιτέρω. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης προκύπτει ως κύριο προϊόν από την υδρόλυση του καρβαμιδικού δεσμού του oxamyl και έχει αναφερθεί ως το κύριο προϊόν μεταβολισμού του oxamyl στο έδαφος (Ou and Rao, 1986). Η υδρόλυση του oxamyl και ο σχηματισμός oxamyl oxime αποτελούν ένα βήμα αποτοξικοποίησης καθώς το προϊόν μεταβολισμού είναι κατά πολύ λιγότερο τοξικό σε οργανισμούς μη-στόχους σε σχέση με την μητρική ουσία (EFSA 2005).

Προηγούμενες μελέτες έχουν καταδείξει την ευαισθησία του oxamyl και λοιπών καρβαμιδικών εντομοκτόνων εδάφους στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης (Smelt et al. 1987, Smelt et al., 1996, Osborn et al., 2010a). Έτσι αξιολογήθηκε το ιστορικό χρήσης oxamyl στα διάφορα εδάφη ως παράγοντας που επιταχύνει την διάσπαση του νηματωδοκτόνου. Στατιστική ανάλυση one-way ANOVA με μοναδικό παράγοντα το ιστορικό του εδάφους σε χρήση oxamyl και εξαρτώμενη μεταβλητή τον χρόνο ημιζωής έδειξε ότι το ιστορικό του εδάφους δεν

επηρέασε σημαντικά ($p = 0.880$) την υπολειμματικότητα του oxamyl. Το παραπάνω αποτέλεσμα έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει την εξάρτηση του oxamyl από την επιταχυνόμενη μικροβιακή διάσπαση. Θα πρέπει να τονιστεί όμως ότι στην συγκεκριμένη μελέτη η ύπαρξη ή όχι ιστορικού oxamyl αξιολογήθηκε με βάση στοιχεία που δόθηκαν από τους παραγωγούς χωρίς να είμαστε σε θέση να αξιολογήσουμε την εγκυρότητα τους. Η περιορισμένη εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης για το oxamyl στα εδάφη από την περιοχή του Λασιθίου θα μπορούσε να αποδοθεί και στα ιδιαίτερα χαμηλά pH τους, που με εξαίρεση το έδαφος 2 (pH 6.93) κυμάνθηκαν από 4,14 ως 5,48 (μ.ο. 4,97). Προηγούμενες μελέτες έχουν καταδείξει την περιορισμένη εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης σε όξινα εδάφη (Smelt et al., 1996; Karpouzas et al. 2004; Suett et al. 1996).

Ο ρόλος των μικροοργανισμών στην αποδόμηση του oxamyl στα συγκεκριμένα εδάφη αξιολογήθηκε με την παράλληλη παρακολούθηση της διάσπασης του νηματοδοκτόνου σε εδάφη που αποστειρώθηκαν με μια σχετικά ήπια μέθοδο αποστείρωσης (χλωροφόρμιο). Έτσι στα δείγματα εδάφους που αποστειρώθηκαν με χλωροφόρμιο οι τιμές DT50 για το oxamyl κυμάνθηκαν από 3,7 έως 38 μέρες (μ.ο. = 13,5 ημέρες) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μη αποστειρωμένα εδάφη όπου οι τιμές DT50 κυμάνθηκαν από 3,4 έως 26 ημέρες (μ.ο. = 11.7 ημέρες). Στατιστική ανάλυση one-way ANOVA με εξαρτημένη μεταβλητή τον χρόνο ημιζωής και κύριο παράγοντα την αποστείρωση ή μη των εδαφών έδειξε ότι γενικότερα η αποστείρωση δεν οδήγησε σε σημαντική επιβράδυνση ($p=0.660$) της αποδόμησης του oxamyl στα διάφορα εδάφη. Αυτό μπορεί να αποδοθεί είτε στην περιορισμένη συμμετοχή των μικροοργανισμών στην αποδόμηση του oxamyl είτε σε μειωμένη επιτυχία και διάρκεια της αποστείρωσης των εδαφών. Εξαίρεση στα παραπάνω αποτέλεσαν τα εδάφη Λασιθί 2, 5 και 6 (ιδιαίτερα στο δείγμα 5) όπου η αποστείρωση με χλωροφόρμιο οδήγησε σε σημαντική επιβράδυνση της διάσπασης του oxamyl επιβεβαιώνοντας την συμμετοχή των μικροοργανισμών στην αποδόμηση του oxamyl στα συγκεκριμένα εδάφη. Η διαφοροποίηση των συγκεκριμένων εδαφών είναι πιθανό να οφείλεται στην ανάπτυξη στα εδάφη αυτά πληθυσμού εξειδικευμένων καταβολικών μικροοργανισμών που είναι προσαρμοσμένοι σε συνθήκες όξινου pH και

χρησιμοποιούν το oxamyl ως πηγή ενέργειας για την αύξηση τους (Osborn et al., 2010b) Τα εδάφη 5 και 6 παρουσίαζαν, κατά δήλωση των παραγωγών, ιστορικό χρήσης oxamyl και παρά το όξινο pH τους παρουσίασαν αυξημένη μικροβιακή καταβολική ικανότητα, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες από τους Smelt et al. (1996) που έδειξαν ότι σε όξινο έδαφος (pH 4.5) με ιστορικό χρήσης oxamyl κατά τα τελευταία 10 έτη δεν εμφανίστηκε επιταχυνόμενη βιοδιάσπαση του oxamyl. Αρκετές προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η μικροβιακή διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων και ειδικότερα η επιταχυνόμενη μικροβιακή διάσπαση ευνοείται σε εδάφη με ουδέτερα προς αλκαλικά pH (Giannakou & Karpouzas 2002).

Στα εδάφη από την περιοχή των Μαλίων αξιολογήθηκε και η διάσπαση του oxamyl σε δείγματα που αποστειρώθηκαν με αυτόκαυστο (ιδιαίτερα δραστική μέθοδος που προκαλεί καταστροφές στην δομή και στην σύσταση της οργανικής ύλης του εδάφους (Shaw et al. 1999) σε αντιπαραβολή με εδάφη που αποστειρώθηκαν με αυτόκαυστο τα οποία στην συνέχεια εμβολιάστηκαν με φρέσκο έδαφος και επωάστηκαν για 10 ημέρες ώστε να επανεγκατασταθεί η μικροβιακή κοινότητα στο αποστειρωμένο έδαφος (απόλυτος βιολογικός μάρτυρας). Σύμφωνα με τους Shaw et al. (1999) τα παραπάνω αποστειρωμένα – εμβολιασμένα δείγματα αποτελούν το πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα – μάρτυρα ώστε να μελετήσουμε ρεαλιστικά τον ρόλο των μικροοργανισμών στην διάσπαση ξενοβιοτικών μορίων στο έδαφος. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην υπολειμματικότητα του oxamyl μεταξύ των δειγμάτων από τα Μάλια που αποστειρώθηκαν ή αποστειρώθηκαν και επανεμβολιάστηκαν με νέο έδαφος. Το παραπάνω αποτελεί περαιτέρω ένδειξη για τον σημαντικό ρόλο αβιοτικών παραγόντων όπως το pH στην διάσπαση του oxamyl, ιδιαίτερα στα συγκεκριμένα εδάφη που χαρακτηρίζονται από ουδέτερα προς αλκαλικά pH που ευνοούν την αβιοτική υδρόλυση του oxamyl (Osborn et al. 2010a).

Σε συνέχεια της παρατήρησης ότι οι μικροοργανισμοί δεν φαίνεται να παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην διάσπαση του oxamyl στα περισσότερα εδάφη που μελετήθηκαν, αξιολογήθηκε η επίδραση αβιοτικών παραγόντων όπως το pH στην αποδόμηση του oxamyl. Στατιστική ανάλυση έδειξε ότι υπήρχε σημαντική ($p < 0.05$) αρνητική συσχέτιση (Pearson correlation coefficient - 0.556), μεταξύ του DT50 των εδαφών που δεν υπέστησαν αποστείρωση με

χλωροφόρμιο και του pH. Δηλαδή παρατηρήθηκε αυξημένη υπολειμματικότητα του oxamyl στα εδάφη με όξινο pH. Η συγκεκριμένη αρνητική συσχέτιση κατέστη μη στατιστικά σημαντική ($p=0.090$) όταν στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν και DT50 τιμές από τα δείγματα που είχαν υποστεί αποστείρωση με χλωροφόρμιο καταδεικνύοντας ότι και άλλοι παράγοντες (όπως η μικροβιακή διάσπαση) εκτός του pH, συνεισφέρουν μερικώς στην εξήγηση της τύχης του oxamyl στα συγκεκριμένα εδάφη.

4.2.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Από την συγκεκριμένη μελέτη πρόέκυψαν συνοπτικά τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η υδρόλυση αποτελεί την κύρια μεταβολική οδό του oxamyl στο έδαφος με παραγωγή oxamyl oxime
- Το ιστορικό εφαρμογής oxamyl δεν οδήγησε σε εκτεταμένη εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης και αυτό πιθανότατα οφείλεται στα όξινα pH των εδαφών στην περιοχή του Λασιθίου που αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη του φαινομένου
- Η μικροβιακή διάσπαση δεν παίζει τον καθοριστικό ρόλο στην αποδόμηση του oxamyl στα περισσότερα από τα εδάφη που μελετήθηκαν.
- Το εδαφικό pH αποτέλεσε τον σημαντικότερο παράγοντα που επηρεάζει την υπολειμματικότητα του oxamyl στο έδαφος και παρουσίασε σημαντική αρνητική συσχέτιση με το DT50.

Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην εξακρίβωση του μικροβιακού μηχανισμού αποδόμησης του oxamyl στα εδάφη Λασιθι 5 και 6 που εμφανίζονται να παρουσιάζουν έντονη καταβολική δραστηριότητα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Accineli C., Dinelli G., Vicari A., Catizone P., (2001). Atrazine and metabolachlor degradation in subsoil. *Biology and Fertility of Soils* 33: 495-500

Aislabie J., and Liloyd-Jones G., (1995). A Review of Bacterial Degradation of Pesticides. *Australian Journal of Soil Research.* 33, 925-942.

Alexander M., (1985). Biodegradation of organic chemicals. *Environment Science and Technology.* 8, 106-111.

Allison, L.E., (1965). Organic carbon In BlaCK, C.A., (ed) Methods of soil analysis. *Agronomy* 9: 1367-1389.

Ambrose, E., Haydock, P.P.J. and Wilcox, A. (2000). Degradation of the nematicide oxamyl in field conditions. *Aspects of Applied Biology* 59, 41-51.

Anderson J.P.E., Nevermann K. and Haidt H., (1998.) Accelerated microbial degradation of nematicides in soils: Problem and its management. In: Proceedings of the XII Acorbat Meeting. Guayaquil, Ecuador, pp 568-579

Arbeli Z., Fuentes C.L. (2007). Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions: and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection*, 26: 1733-1746.

Bjørling-Poulsen M., Raun Andersen H. & Grandjean P. (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *BioMed Central.* 7:50.

Bollag J.M. and Liu S.Y., (1990). Biological transformation processes of pesticides, in *Pesticides in the soil environment : processes, impacts and modeling*. Soil Science Society of America. 169-261.

Bromilow R.H., Baker R.J., Freeman M.A.H., Corog K. (1980). The degradation of aldicarb and oxamyl in soil. *Pesticide Science*. 11:371-378

Chapman, R.A., Harris, C.R. (1990) Enhanced degradation of insecticides in soils. In: Racke, K.D., Coats, J.R., (Eds) *Enhanced biodegradation of pesticides in the environment*, American Chemical Society, Washington, DC, pp 82-96.

Di H.J., Aylmore L.A.G. and Kookana R.S. (1998). Degradation rates of eight pesticides in surface and subsurface soils under laboratory and field conditions. *Soil Science* 163: 404-411

EFSA Scientific report (2005). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance oxamyl. EFSA, 14 January 2005, Parma, Italy, p 1-78.

Fact Sheet Population Health Branch. (2002). Carbamate Insecticides. Queensland Government.

Felsot A.S. (1989). Enhanced biodegradation of insecticides in soil: implications for agroecosystems. *Annual Review of Entomology* 34: 453-476

FOCUS (2006). Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration, Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference Sanco/10058/2005 version, 2.0, 2006, 434 pp.

Felsot A.S., Shelton D.R. (1993). Enhanced biodegradation of soil pesticides: Interactions between physicochemical process and microbial ecology. *SSSA Special Publication* 32: 227-251

Gerstl Z. (1984). Adsorption, decomposition and movement of oxamyl in soil. *Pesticide Science*, 15:9-17.

Harvey, J., Jr. and Han, J.C-Y. (1978) Decomposition of oxamyl in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26(3), 536-541.

Hawkins, D.R., Mayo, B.C., Pollard, A.D. and Donschak, W.W. (1989). The metabolism of ¹⁴C-oxamyl in silt loam soil under aerobic and anaerobic conditions. E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, U.S.A. DuPont Report No. AMR 1200-88.

Karpouzas D.G., Giannakou I.O., Walker A., Gowen S.R. (1999b). Reduction in biological efficacy of ethoprophos in a soil from Greece due to enhanced bio-degradation: Comparing bioassays with laboratory incubation data. *Pesticide Science* 55: 1089-1094

Karpouzas, D.G., and Giannakou, I.O. (2002). Biodegradation and Enhanced Biodegradation: A reason for reduced biological efficacy of nematicides. *Russian Journal of Nematology* 10: 59-78

Karpouzas, D.G., Hatziapostolou, P., Papadopoulou-Mourkidou, E., Giannakou, I.O., Georgiadou, A. (2004). The enhanced biodegradation of fenamiphos in soils from previously treated sites and the effect of soil fumigants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 2099-2107.

Karpouzas, D.G., Karanasios, E., Menkissoglou-Spiroudi, U. (2004) Enhanced microbial degradation of cadusafos in soils from potato monoculture: demonstration and characterization. *Chemosphere* 56: 549-559.

Karpouzas D.G., Walker A. (2000a). Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* strains epl and II to degrade the organophosphate ethoprophos. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 40-48.

Karpouzas D.G., Walker A., (2000b). Aspects of the enhanced biodegradation and metabolism of ethoprophos in soil. *Pest Management Science* 540-548

Karpouzas, D.G., and Walker, A. (2000c). Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epl to degrade ethoprophos in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1753-1762

Karpouzas D.G., Walker A., Froud-Williams R.J.,Drennan D.S.H. (1999). Evidence for the enhanced biodegradation of ethoprophos and carbofuran in soils from Greece and the UK. *Pesticide Science* 55: 301-311

Kookana R. S., Baskaran S., and Naidu R., (1998). Pesticide fate and behaviour in Australian soils in relation to contamination and management of soil and water: a review, *Australian Journal of Soil Research.* 36, 715-764

Kuhr R.J., Dorough H.W., (1976). Carbamate insecticide: Chemistry, Biochemistry and Toxicology, CRC Press Inc.

Levanon D., (1993). Roles of Fungi and Bacteria in the mineralization of pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. *Soil Biology & Biochemistry.* 25, 1097-1105.

Malato S., Caceres J., Agüera A., Mezcua M., Hernando D., Vial J., Fernandez-Alba A.R., (2001). Degradation of imidacloprid in water by photo-Fenton and TiO₂ photocatalysis at a solar pilot plant: A comparative study, *Environmental Science and Technology*, 35, 4359-4366.

Mattson, S.L. and Smyser, B.P. (2000). Rate of degradation of oxamyl in three aerobic soils. E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, U.S.A. DuPont Report No. DuPont-2957.

McNally, M.E.P. and Wheeler, J.R. (1988). Hydrolysis of [1-¹⁴C] oxamyl. E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, U.S.A. DuPont Report No.AMR 961-87.

Morel-Chevillet, C., Parekh, N.R., Pautrel, D., Fournier, J.C. (1996). Cross-enhancement of carbofuran biodegradation in soil samples previously treated with carbamate pesticides. *Soil Biology & Biochemistry* 28:1767-1776.

Nelson, D.W., and L.E. Sommers. (1982). Total carbon, organic carbon, and organic matter. In Page, A.L., R.H. Miller, D.R. Keeney (Eds.) *Methods of soil analysis. Part 2- Chemical and microbiological properties*. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 539-580.

Osborn RK, Haydock PPJ & Edwards SG (2010b). Isolation and identification of oxamyl-degrading bacteria from UK agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 998-1000.

Osborn R.K., Edwards S.G., Wilcox A., Haydock P.P.J. (2010a). Potential enhancement of degradation of the nematicides aldicarb, oxamyl and fosthiazate in UK agricultural soils through repeated applications. *Pest Management Science*, 66, 253-261.

Ou, L.T and P.S.C. Rao (1986). Degradation and metabolism of oxamyl and fenamiphos in soils. *Journal of Environmental Science and Health*, Vol B21, p. 25-40

Racke K., Coats J.R. (1988). Comparative degradation of organophosphorus insecticides in soil: Specificity of enhanced microbial degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 193-199

Rao PSC and Hornsby AG, (2001). Behavior of pesticides in soil and water. Institute of food and Agricultural Science, University of Florida. Florida. U.S.A.

Read D.C (1986a). Accelerated microbial breakdown of carbofuran in soil from previously treated fields. *Agriculture Ecosystems and Environment* 15: 51-61

Read D.C. (1986b). Greatly accelerated microbial degradation of Aldicarb in re-treated field soil, in flooded soil and in water. *Journal of Economic Entomology* 80: 156-163

Shaw, L.J., Beaton, Y., Glover, L.A., Killham, K., Meharg, A.A., (1999). Reinoculation of autoclaved soil as a non-sterile treatment for xenobiotic sorption and biodegradation studies. *Applied Soil Ecology* 11, 217-226.

Simon L, Spiteller M, Wallnofer P.R. (1992). Metabolism of fenamiphos in 16 soils originating from different geographic areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 312-317

Singh B. K., Walker A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 428-471

Smelt J.H., Ariettr E., Van de Peppel-Groen, Van der Pas L.J.T., Dijksterhuis A. (1996). Development and duration of accelerated degradation of nematicides in different soils. *Soil Biology & Biochemistry* 28: 1757-1765

Smelt, J. H., A. Dekker and Leistra, M. (1979). Effect of soil moisture content on the conversion rate of oxamyl. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 27, 191-8.

Smelt J, Dekker A, Leistra M, Houx N. (1983). Conversion of four carbamoyloximes in soil samples from above and below the soil water table. *Pesticide Science*. 14:173-181.

Smelt J.H., Crum S.J.H., Teunissen W. and Leistra M. (1987). Accelerated transformation of aldicarb, oxamyl and ethoprophos after repeated soil treatments. *Crop Protection* 6: 295-303

Somasundaram L., Jayachandran K., Kruger E.L., Racke K.D., Moorman T.B., Dvorak T. and Coats J.R. (1993). Degradation of isazofos in the soil environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 313-318

Spare, W.C. (1991). Anaerobic soil metabolism of [1-14C]oxamyl in Madera, California soil. E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, U.S.A. DuPont Report No. AMR 1851-90.

Suett D.L., Fournier J-C., Papadopoulou Mourkidou E., Pussemier L., Smelt J. (1996). Accelerated degradation : the European dimension. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1741-1748

Suett D.L., Jukes A.A. (1988). Accelerated degradation of aldicarb and its oxidation products in previously treated soils. *Crop Protection* 7, 147-152

Suett D.L., Jukes A.A., Parekh N.R. (1996b). Non-specific influence of pH on microbial adaptation and insecticide efficacy in previously-treated field soil. *Soil Biology & Biochemistry* 28, 1783-1790

Tagusawava F., Jacobson R. A. (1977). Crystal and Molecular Structure of Carbamate Insecticides. 1. Mesurol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 329.

Topp E., Vallaes T., Soulas G., (1995). Pesticides: Microbial degradation and effects on microorganisms. *Modern soil Microbiology*, pp. 547-575

Walker A. and Roberts S.J. (1993). Degradation, biodegradation and enhanced biodegradation. In: *Proceedings IX Symposium Pesticide Chemistry*, Piacenza, Italy, pp: 357-370

Walker, A., Brown, P.A., Entwistle, A.R. (1986). Enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soils. *Pesticide Science* 17:183-193.

WHO (World Health Organization), (1979). «Environmental health criteria 9: DDT», *Arch. Environmental Health* 33:169.